

Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeation von Hydrocortison und Prednicarbat durch excidiertes humanes Stratum corneum und ein organotypisches Hautkonstrukt

Vom Fachbereich für Chemie und Pharmazie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
Dissertation

von Ilka Brinkmann
aus Ibbenbüren

1. Referentin: Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann
2. Referent: Herr Prof. Dr. R. Neubert / Halle (Saale)
eingereicht am: 22.8.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.12.2005

Druckjahr 2006

Für meine
Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Neubert danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die fachlichen Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt hierbei dem Team des Zellkulturlabors für die Bereitstellung der Hautkonstrukte und der Hilfe bei Permeationen und Metabolisierungen. Frau Jahn und Frau Schildt möchte ich für die Durchführung der Röntgenmessungen bzw. DSC-Messungen danken.

Herrn Dr. Flory vom Hollwede-Krankenhaus Braunschweig danke ich für die Überlassung der Hautproben.

Herrn Dr. Till Beuerle danke ich für die Durchführung der Gaschromatographie.

Ferner möchte ich mich bei den unter Abschnitt 3.1 aufgeführten Firmen für die freundliche Überlassung von Untersuchungsmaterialien bedanken.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereiches für Chemie und Pharmazie, vertreten durch Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Comparison of commercial hydrocortisone formulations with regard to their permeation behaviour through excised stratum corneum, in: Eds. R. Marks, J.-l. Lévêque, R. Voegeli (Hrsg), The essential stratum corneum, Martin Dunitz Ltd. London 203-206 (2002))
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Role of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both in hydrocortisone permeation across human stratum corneum. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 16: 393-404 (2003)
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum. Die Pharmazie 60: 215-220 (2004)
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Comparison of prednicarbate percutaneous penetration across artificial skin constructs and excised human stratum corneum from commercial formulations and their variations (eingereicht)

Tagungsbeiträge

- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Comparison of commercial hydrocortisone formulations with regard to their permeation behaviour through excised stratum corneum (Poster), Kongress: Stratum Corneum III, 12.-14. September, 2001, Basel
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Influence of isopropyl myristate on hydrocortisone permeation through excised human stratum corneum (Poster), 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 8.-11. April 2002, Florenz

- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Influence of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both on hydrocortisone permeation across human stratum corneum (Vortrag), Jahrestagung der DPhG, 9.-12. Oktober 2002, Berlin, Abstract in Arch. Pharm. Med. Chem. 335, Suppl. 1, 57 (2002)
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Influence of adjuvants on human stratum corneum microstructure, a DSC- and X-ray-study (Poster), Symposium Skin and Formulation, 23.-24. Oktober 2003, Paris
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., Permeation through artificial skin construct from different formulations and their dilutions, International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, 15.-18. März 2004, Nürnberg

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Allgemeiner Teil	3
2.1 Die Haut und ihre Aufgaben	3
2.1.1 Allgemeiner Aufbau der Haut	3
2.1.2 Das Stratum corneum	5
2.1.2 Aufbau des Stratum corneums	5
2.1.2.2 Barrierefunktion der Stratum corneum Lipide	7
2.1.2.3 Permeation durch das Stratum corneum	8
2.1.2.4 Permeation durch Keratinozytenkulturen	11
2.1.2.5 Metabolisierung in der Haut	12
2.1.2.6 Physikochemische Eigenschaften des Stratum corneum und dessen Lipide	12
2.1.2.7 Strukturveränderungen des Stratum corneums durch Wechselwirkungen mit Vehikelkomponenten	15
2.2 Arzneistoffe	22
2.2.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen von Hydrocortison und dessen Weiterentwicklungen	22
2.2.2 Weiterentwicklungen des Hydrocortisons	24
2.2.3 Der Arzneistoff Prednicarbat	25
2.3 Applikation auf der Haut	26
2.3.1 Dermale Zubereitungen	26
2.3.2 Freisetzungen und bisherige Permeationsergebnisse	27
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Arzneistoffe	29
3.1.2 Hilfsstoffe	29
3.1.3 Verbrauchsmaterialien und Puffersubstanzen für die HPLC	29

3.1.4 Handelspräparate	30
a) Hydrocortison-Präparate	30
b) Prednicarbat-Präparate	31
3.2 Methoden	32
3.2.1 Herstellung und Charakterisierung der Formulierungen	32
3.2.1.1 Herstellung der Formulierungen	32
a) hydrocortisonhaltiger Formulierungen	32
b) prednicarbat-haltige Formulierungen	33
3.2.1.2 Dichte der Formulierungen	33
3.2.1.3 Bestimmung der Sättigungskonzentration	34
a) Im Medium	34
b) In der Formulierung	34
3.2.1.4 Polarisationsmikroskopie	34
3.2.1.5 Phasenlage der Formulierung	34
3.2.1.6 Säulenchromatographie	34
3.2.1.7 Dünnschichtchromatographie	35
3.2.1.8 Gaschromatographie	35
3.2.1.9 Thermogravimetrie	36
3.2.2 Permeationsuntersuchungen und dessen Vorbereitungen	36
3.2.2.1 Isolierung von Stratum Corneum	36
3.2.2.2 Artificial Skin Construct-Herstellung	37
3.2.2.3 Puffer für die Permeation und pH-Bestimmung	38
3.2.2.4 Permeationsuntersuchungen	38
3.2.2.5 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	39
a) Hydrocortison	39
b) Prednicarbat	40
3.2.3 Stratum Corneum Charakterisierung	40
3.2.3.1 Arzneistoffsättigung im Stratum corneum	40
a) Hydrocortison	40
b) Prednicarbat	41
3.2.3.2 Metabolisierung	41
3.2.3.3 Neutralrot- und MTT-Test	42
3.2.3.4 Dynamische Differenzkalorimetrie	43

3.2.3.5 Röntgenweitwinkelbeugung nach Debeye-Scherrer	43
3.2.3.6 Röntgenkleinwinkelbeugung nach Kiessig	44
3.2.3.7 Varianzanalyse	44
4 Versuchsergebnisse und Diskussion	45
4.1 Hydrocortison-Präparate	45
4.1.1 Einfluss von Isopropylmyristat, Isopropylalkohol und deren Kombination in wasserhaltiger hydrophiler Salbe auf excidiertes humanes Stratum corneum	45
4.1.1.1 Permeationen von Hydrocortison aus wasserhaltiger hydrophiler Salbe versetzt mit Isopropylmyristat und Isopropylalkohol	45
4.1.1.2 Sättigungskonzentrationen von Hydrocortison in verschiedenen Medien, den Formulierungen und vorbehandeltem Stratum corneum	48
4.1.1.3 Thermoanalytische Untersuchungen von vorbehandeltem Stratum corneum	51
4.1.1.4 Röntgenuntersuchungen von vorbehandeltem Stratum corneum	54
a) Röntgenweitwinkelmessung	54
b) Röntgenkleinwinkelmessung	55
4.1.1.5 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluss von Isopropylmyristat, Isopropylalkohol und deren Kombination auf humanem Stratum corneum	58
4.1.2 Vergleich hydrocortisonhaltiger Fertigarzneimittel	62
4.1.2.1 Permeationen von Hydrocortison aus Fertigarzneimitteln	62
4.1.2.2 Thermoanalytische Untersuchungen von vorbehandeltem Stratum corneum	65
4.1.2.3 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluß einzelner Fertigarzneimittel auf humanes Stratum corneum	67
4.1.3 Einfluss von Glycerol, Propylenglykol und einer Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat auf die Stratum corneum-Lipide	68
4.1.3.1 Thermoanalytische Untersuchungen des vorbehandelten Stratum corneums	68
4.1.3.2 Röntgenmessungen des Stratum corneums, vorbehandelt mit Glycerol, Propylenglykol, Isopropylmyristat und der Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat	70

a) Röntgenweitwinkeldiffraktometrie	70
b) Röntgenkleinwinkelmessung	71
4.1.3.3 Zusammenfassende Diskussion über die Wirkung von Glycerol, Propylenglykol, Isopropylmyristat sowie der Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat und der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Fertigarzneimittel-Daten	72
4.2. Prednicarbat-Präparate	77
4.2.1 Metabolisierung von Prednicarbat durch Hautkonstrukte im Vergleich zu humanem Stratum corneum	77
4.2.2 Prednicarbat-Permeation durch humanes Hautkonstrukt aus originalen und abgewandelten Dermatop-Produkten sowie Vergleich dieser Permeationen mit denen durch humanes excidiertes Stratum corneum	81
4.2.3 Permeation von Prednicarbat durch excidiertes humanes Stratum corneum im Vergleich zu den Hautkonstrukt-Permeationen	89
4.2.4 Sättigungskonzentrationen von Prednicarbat in humanem Stratum corneum nach Vorbehandlung mit den Formulierungen	91
4.2.5 Thermoanalytische Untersuchungen von Stratum corneum nach Vorbehandlung mit Prednicarbat-haltigen Zubereitungen	92
4.2.6 Röntgenmessungen von Stratum corneum, vorbehandelt mit Dermatop [®] Zubereitungen	94
a) Röntgenweitwinkeldiffraktometrie	94
b) Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie	95
4.2.7 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluß Prednicarbat-haltiger Zubereitungen auf humanes Stratum corneum	97
4.3 Gehaltsbestimmung von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol in der Dermatop [®] Salbe und deren Einfluß auf excidiertes humanes Stratum corneum	101
4.3.1 Charakterisierung von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol und Rezepturvorschläge zur Imitation der Dermatop [®] Salbe	102
4.3.2 Thermoanalytische Untersuchungen von excidiertem humanem Stratum corneum vorbehandelt mit den verschiedenen Modellrezepturen	103

4.3.3 Röntgenmessungen von excidiertem Stratum corneum nach Vorbehandlung mit den Modellrezepturen	105
a) Röntgenweitwinkelbeugung	106
b) Röntgenkleinwinkelbeugung	106
4.3.4 Permeationen von Prednicarbat aus der Rezeptur B im Vergleich zu den Dermatop® Zubereitungen	108
4.3.5 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluss von Octyldodecanol und Glycerolmonostearat auf excidiertes humanes Stratum corneum	110
5 Abschlussdiskussion	112
5.1 Einfluss von Isopropylmyristat, Isopropylalkohol und deren Kombination in wasserhaltiger hydrophiler Salbe auf excidiertes humanes Stratum corneum	112
5.2 Vergleich hydrocortisonhaltiger Fertigarzneimittel hinsichtlich ihrer Permeation durch humanes Stratum corneum	113
5.3 Einfluss von Glycerol, Propylenglykol und einer Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat auf die Stratum corneum-Lipide	114
5.4 Einfluss der Prednicarbat-Fertigarzneimittel auf humanes Stratum corneum und Hautkonstrukte	115
5.5 Charakterisierung von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol als mögliche permeationsfördernde Substanzen in der Dermatop® Salbe hinsichtlich deren Einfluss auf Stratum corneum	118
6 Zusammenfassung	120
7 Literaturverzeichnis	122
8 Anhang	136
8.1 Original-Formulierungen	136
a) Dermatop® Salbe	136
b) Dermatop® Fettsalbe	136
c) Dermatop® Creme	137
8.2 Verdünnte Formulierungen	137
a) Dermatop® Salbe	137

b) Dermatop [®] Fettsalbe	138
c) Dermatop [®] Creme	138
8.3 Mischungen	139
a) Salbe/Fettsalbe	139
b) Salbe/Creme	139
8.4 Formulierungen mit Enhancer-Kombination	140
a) Salbe mit Enhancer-Kombination	140
b) Fettsalbe mit Enhancer-Kombination	140
c) Creme mit Enhancer-Kombination	141
8.5 Rezeptur B	141

1 Einleitung

Kortikosteroide gehören zu einer der wichtigsten Substanzgruppen bei der topischen Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen. Neben Hydrocortison als körpereigenem Hormon sind eine Reihe weiterer Substanzen unterschiedlicher Potenz und Nebenwirkungsprofile auf dem Markt erhältlich. Außerdem werden sehr unterschiedliche Zubereitungen angeboten, um der Behandlung verschiedenster Hautzustände gerecht zu werden. So ist eine Rezeptierung dieser Fertigarzneimittel mit deren Grundlagen, zusätzlichen Hilfsstoffen oder auch weiteren Fertigarzneimitteln unter Medizinern üblich und dient der individuellen Therapie des Patienten.

In der Dissertation von Alberg (1998) wurden ausgewählte Fertigarzneimittel bezüglich ihres Einflusses auf die Permeation von Hydrocortisonacetat durch excidiertes humanes Stratum corneum untersucht. Bis auf eine Ausnahme, die Soventol[®] HC Creme (Dr. Rentschler Arzneimittel GmbH & Co., D-Laupheim), konnte allerdings keine Permeationserhöhung durch Hilfsstoffe in den Zubereitungen beobachtet werden. Die Permeation von Hydrocortison aus verschiedenen Arzneibuch-Grundlagen und deren Verdünnungen untereinander ergab ebenfalls, auch mit Blick auf eine mögliche Korrelation zwischen Freisetzung und Rheologie, keine Unterschiede (Refai, 2001). Allerdings konnte der Grundlage der Soventol[®] HC Creme eine permeationsfördernde Wirkung auf das humane excidierte Stratum corneum im Fall von auch für Hydrocortison nachgewiesen werden. Mit der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob und wie Hilfsstoffe in den Hydrocortison-Fertigarzneimitteln die Lipidstruktur des excidierten humanen Stratum corneum und damit die Arzneistoffpermeation modifizieren.

Die neuere Arzneistoffentwicklung führt, neben der Abkopplung der antiproliferativen von der gewünschten antiinflammatorischen Wirkung, zu Wirkstoffen, die in sich sowohl das Prodrug- als auch das Softdrug-Prinzip vereinen. Das setzt eine gewisse Metabolisierungsfähigkeit der Haut voraus. Hinsichtlich dieser Thematik ist ein Vergleich zwischen Hydrocortison, dem ersten Kortikosteroid, und einem moderneren Wirkstoff, dem Prednicarbat, von Interesse. Prednicarbat wird derzeit als Dermatop[®] Salbe, Creme und Fettsalbe (Aventis, D-Frankfurt am Main) auf dem Pharmamarkt vertrieben. Zusätzlich werden die jeweiligen Basisformulierungen angeboten. Damit soll eine Intervalltherapie, aber auch die Möglichkeit zur Rezeptur dieser Zubereitungen gegeben werden. Es stellt sich jedoch die Frage nach der Effizienz dieser Therapien in Bezug auf die Permeation durch die Haut und auf eine eventuelle Beeinflussung der Stratum corneum-Lipidmatrix.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich demnach mit folgenden Punkten umschreiben:

- Vergleich weiterer Hydrocortison-Fertigarzneimittel hinsichtlich der Permeation von Hydrocortison
- Strukturanalytische Aufklärung der Wirkmechanismen permeationsfördernder Hilfsstoffe aus den untersuchten Fertigarzneimitteln
- Permeationsverhalten der Dermatop[®]-Formulierungen und deren Rezepturen auch hinsichtlich der Metabolisierung in der Dermis
- Anwendung der Erkenntnisse über permeationsfördernde Hilfsstoffe auf Prednicarbat als Vertreter der modernen Kortikosteroide

2 Allgemeiner Teil

2.1 Die Haut und ihre Aufgaben

Die menschliche Haut hat eine Oberfläche von etwa $1,2\text{--}2\text{ m}^2$ und ohne Unterhautfettgewebe ein Gewicht von 3 kg. Die durchschnittliche Hautdicke beträgt etwa 1,5 mm, wovon etwa 0,1 mm auf die Epidermis entfallen.

Neben ihrer Funktion als Sinnesorgan mit ihren Tast-, Temperatur-, und Schmerzrezeptoren nimmt sie Schutzfunktionen und Stoffwechselaufgaben wahr. Zu den Schutzfunktionen gehören der mechanische Schutz durch Dermis und Subcutis sowie die Thermoregulation, wobei einerseits durch das subcutane Fettgewebe Isolierung und andererseits durch Weitstellung des Gefäßnetzes eine Wärmeabgabe ermöglicht wird. Hinzu kommt durch Melaninbildung UV-Schutz, durch die Hautflora Infektionsschutz und - durch die Präsenz der Langerhans'schen-Zellen in der Epidermis - ein immunologischer Schutz. Außerdem erfüllt die Haut eine Reihe von Stoffwechselaufgaben, wie die Synthese des Provitamins D3 und der Melanine sowie von Strukturproteinen wie Kollagen, Keratin und Elastin. Über die Haut können zudem Stoffe aufgenommen, ausgeschieden und gespeichert werden. Die Hauptaufgabe der Haut aber ist die Barrierefunktion zur Verhinderung des Eindringens fremder Substanzen in den Körper. Im Folgenden wird eine grobe Übersicht über die Morphologie der Haut gegeben, um dann die Vorgänge bei der Arzneistoff-Resorption und -Permeation besser verständlich zu machen.

2.1.1 Allgemeiner Aufbau der Haut

Die Haut setzt sich von innen nach außen im Wesentlichen aus der Subcutis, der Dermis und der Epidermis zusammen (Abb.2.1).

Die Subcutis wird durch zahlreiche Blutgefäße versorgt und enthält das Unterhautfettgewebe. Dieses dient nicht nur als Speicher für überschüssiges Körperfett, sondern auch zur Thermoregulation und zum Schutz gegen mechanische Einwirkungen.

Die sich anschließende Dermis ist ein zweischichtiges Nähr- und Stützgewebe, das aus einem Netzwerk unlöslicher Strukturproteine, hauptsächlich Kollagen, aufgebaut ist. Dadurch erhält es eine hohe Reißfestigkeit und Elastizität. Eingelagert in die Dermis finden sich Blutgefäße, Nerven, Schweißdrüsen und Haarwurzeln. Die innere Dermis, das Stratum reticulare, besteht

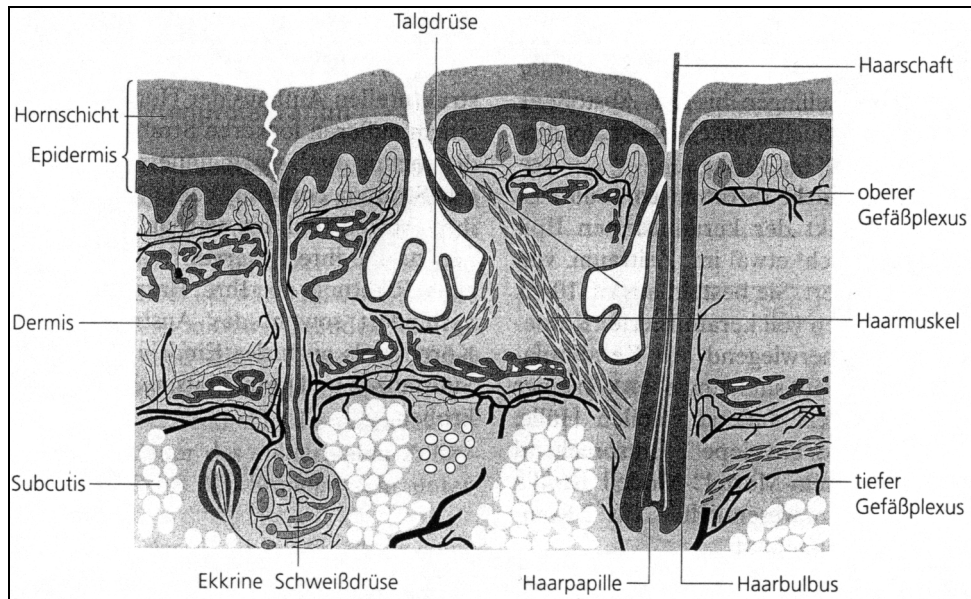


Abbildung 2.1: Allgemeiner Aufbau der Haut (Neubert et al., 2001)

aus einem straffen Kollagenfasernetz und Fibroblasten, während die äußere Dermis, das Stratum papillare, ein eher lockeres Kollagenfasernetz darstellt, in das Fibroblasten eingelagert sind und das von Gefäßen und Nervenenden durchzogen wird. Anzahl, Zellgröße und biosynthetische Aktivität der Fibroblasten nehmen von der retikulären zur papillären Dermis hin zu. Die Hauptaufgabe der Dermis besteht in der Versorgung der Epidermis, was durch ein feines Gefäßnetz gewährleistet wird. Außerdem dienen die hier lokalisierten Mastzellen als Speicher für biologisch aktive Substanzen wie z.B. Histamin. Die geschwungene Oberfläche der Dermis ist mit der Epidermis verzahnt, welche die äußere Schicht und zugleich Hauptbarriere gegen Umwelteinflüsse darstellt.

Je nach Hautregion variiert die Dicke der Epidermis zwischen 0,3 und 4 mm. Histologisch besteht die Epidermis, die vollständig durch die Dermis ernährt wird, aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel, wobei die Keratinozyten von der Basalzellschicht, direkt von der Dermis aus, nach außen wandern. Dabei erfährt sie ihre Differenzierung und Apoptose, um dann die letzte Schicht, das Stratum corneum zu bilden. Dieser Prozess dauert in der Regel 28 Tage, kann aber durch pathologische Zustände, wie z.B. bei einer Psoriasis, auf nur 3 Tage verkürzt werden.

Bedingt durch die Differenzierung der Keratinozyten ergibt sich die Einteilung der Epidermis in verschiedene Schichten: In unmittelbarem Kontakt mit der Dermis ist die Basalzellschicht (Stratum basale), für welche neben Melanozyten, Merkelzellen, Lymphozyten und Langerhans'schen Zellen vor allem die Anwesenheit lebender mitotisch aktiver Zellen, der

Keratinocyten, charakteristisch ist. Diese mit Desmosomen untereinander verknüpften Zellen bilden eine Vorstufe des Keratins aus, die so genannten Tonofillamente. Die Mitose wird über eine Hemmung der Chalone synthese angeregt, wobei z.B. UV-B-Strahlung die Bildung der Chalone hemmt und es so zur Regeneration des Stratum basale kommt. Oberhalb dieser Schicht befindet sich das Stratum spinosum, die Stachelzellschicht. Sie besteht aus 2-5 Zellschichten polyedrischer Zellen. Im Zuge des Differenzierungsprozesses der Keratinocyten kommt es in dieser Schicht neben einer Umorientierung der Zellachse zur Synthese spezieller Zellorganellen, den Odland-bodies (Odland, 1960; Elias, 1981). Diese werden im Golgi-Apparat gebildet und enthalten neben hydrolytischen Enzymen und Keratohyalinkörpern (Tonofibrillen aus Polypeptiden) auch Glycoproteine und bestimmte Lipide. Diese Lipide sind in membranähnlichen Doppelschichten übereinandergestapelt und für die Bildung des späteren Stratum corneum wichtig (Landmann, 1991). In der sich anschließenden Körnerzellschicht (Stratum granulosum) kommt es schließlich zum Zelltod der Keratinocyten, wobei neben der Proteolyse des Zellkerns vor allem die Aggregation der Keratinfilamente von physiologischer Bedeutung ist, da durch Verknüpfung und Vernetzung eine Härtung dieser Strukturen möglich ist. Das Keratohyalin besteht aus einer Mischung unterschiedlicher Proteine, wobei das histidinreiche Profillagrin gut charakterisiert werden konnte (Fritsch, 1990). Im oberen Stratum granulosum zerfällt es zu Fillagrin, das die irreversible Aggregation und Polymerisation der Tonofibrillen auslöst, welche durch Disulfidbrücken vernetzt werden. Die Keratinocyten verhornen so zu abgestorbenen Korneozyten. Gleichzeitig erfolgt eine Exocytose der Odland bodies in den Interzellularraum. Die exocytierten Granula verschmelzen dort zu einer lamellaren Lipidmatrix. Zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum kann ferner noch eine Übergangszellschicht, das Stratum lucidum, liegen, welches sich vor allem durch seinen Anteil an Elastinfasern und die sich daraus ergebenden lichtbrechenden Eigenschaften auszeichnet.

2.1.2 Das Stratum Corneum

2.1.2.1 Aufbau des Stratum corneum

Der Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum ist vor allem durch die Freisetzung der Lipide aus den Odland-bodies in den Interzellularraum gekennzeichnet. Gleichzeitig kommt es zu einer weiteren Aggregation der Keratinfilamente, so dass das

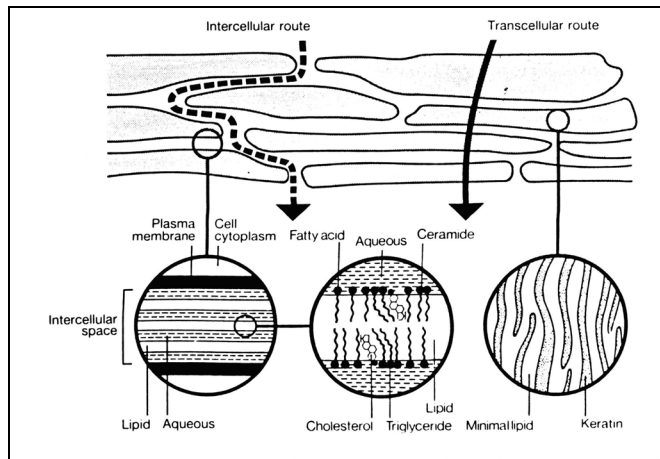


Abbildung 2.2: Backstein-Mörtel-Modell nach Elias und Barry (Barry, 1988)

Stratum corneum insgesamt aus etwa 15-25 Zellschichten toter und kernloser Korneozyten besteht, die stark abgeflacht und mit hexagonaler Form, eine Dicke von insgesamt 0,5-1,5 μm erreichen (Plewig und Marples, 1970). Die Schichtung der Korneozyten wird durch das Backstein-Mörtel-Modell (Abb.2.2) repräsentiert (Barry, 1988; Elias, 1988): Hier werden die Korneozyten als dicht gepackte Bündel aus Keratinfasern und Proteinen verstanden, die von einer dünnen Hülle aus Loricrin, unlöslichen Proteinen und dem Lipidzement aus den Odlandbodies in einer Schichtung ähnlich einer Backsteinmauer zusammengehalten werden. Anstelle einer Phospholipidmembran sind die Korneozyten von einer Hornhauthülle umgeben. Diesen „cornified envelope“ bilden Proteine und Keratin nach Quervernetzung durch Transaminasen (Fritsch, 1990). Histologisch werden die oberflächlichen Zellen als Stratum disjunctum und die 5-6 unteren Zellschichten als Stratum compactum bezeichnet. Das Stratum disjunctum zeichnet sich, bedingt durch eine kleinere Anzahl an Desmosomen, durch einen geringeren Zellzusammenhalt aus. Der Interzellularraum besteht aus Lipiden, deren hochgeordnete Struktur hauptsächlich auf Ceramiden (35%), Cholesterol, Cholesterolderivaten (insgesamt 20-25%) sowie freie Fettsäuren (25%) beruht (Yardley, 1987; Wertz et al., 1989a; Neubert et al., 1996). Phospholipide und Triglyceride machen an der Gesamtmasse nur einen geringen Prozentsatz aus. Nach außen hin werden die Zellen durch eine Zunahme an Keratin dicker, so dass hier ein besonders hoher Permeationsschutz gewährleistet ist. Wasser ist an Keratin gebunden, wobei ein abfallender Gradient vom Körperinneren nach außen herrscht. Dieser Konzentrationsgradient führt zur kontinuierlichen Wasserabgabe an die Umgebungsluft (transepidermaler Wasserverlust, TEWL). So konnten über TEWL-Messungen Veränderungen in der systemischen Absorption von zuvor topisch appliziertem Hydrocortison registriert werden (Aalto-Korte, 1995; Aalto-Korte und Turpeinen, 1995).

Auf der Oberfläche des Stratum corneum entsteht mithilfe der Schweiß- und Talgdrüsen ein Hydrolipidfilm, der vor allem aus Wasser und Lipidbestandteilen, wie Squalen, Wachsester, Triglyceriden, Cholesterol und dessen Estern (Nicolaidis et al., 1968), sowie dem natural moisturizing factor besteht. Dieser bindet vornehmlich Wasser. Durch eine teilweise bakterielle Spaltung von Triglyceriden in Mono-, Diglyceride und freie Fettsäuren entsteht der Säureschutzmantel der Haut, der mit einem pH-Wert von 5,4-5,9 die Infektionsabwehr unterstützt. Er hat kaum Einfluß auf die Barrierefunktion des Stratum corneum, da nach dessen Entfernung kein Anstieg im transepidermalen Wasserverlust als Maß für die Permeabilität gemessen wurde (Rougier et al., 1987). Daneben üben Faktoren wie Temperatur, Luftfeuchte, Krankheiten und Stress einen großen Einfluß auf die Zusammensetzung des Filmes aus.

2.1.2.2 Barrierefunktion der Stratum corneum-Lipide

Das Stratum corneum stellt für die perkutane Absorption von Arzneistoffen die entscheidende Barriere dar. Dieses konnte über eine Korrelation von Stratum corneum-Permeationsdaten und in-vivo-Daten nachgewiesen werden (Franz, 1975). Das Backstein-Mörtel-Modell verdeutlicht den groben Aufbau und damit auch die Barrierefunktion des Stratum corneum. Dabei stellt die interzelluläre Lipidmatrix mit ihrem hydrophoben Charakter die Hauptbarriere dar (Smith et al., 1982). Zusätzlich wird diese Matrix durch einen hohen lamellaren Ordnungsgrad in ihrer Flexibilität erniedrigt: Sphingolipide stabilisieren durch laterale Wasserstoffbrücken, Cholesterolmoleküle zwingen benachbarte Fettsäureketten in regelmäßige Anordnungen und gesättigte Fettsäuren erhöhen aufgrund der Fixierung der Alkylkette zusätzlich die Ordnung (Landmann, 1991). Zudem sind Hydroxyfettsäuren und – acylsphingosine kovalent mit den Proteinen des cornified envelope verbunden, welche als Ankereinheiten zwischen den Lipid- und Korneozytenbereichen verstanden werden (Wertz et al., 1989b). Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Lipide und damit auch die Barrierefunktion ist unter anderem abhängig von Nahrungsmittelfaktoren. So führt zum Beispiel ein Mangel an essentiellen Fettsäuren, die auch Bestandteil der Lipidmatrix im Interzellularraum sind, zu einer Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes (Lowe und Stoughton, 1977). Eine topische und systemische Supplementierung konnte daraufhin die Hautsymptome beheben (Hansen und Jensen, 1985), wohingegen die Extraktion von Hautlipiden durch verschiedene organische Lösungsmittel die Permeabilität und den transepidermalen Wasserverlust erhöhte (Smith et al., 1982).

2.1.2.3 Permeation durch das Stratum corneum

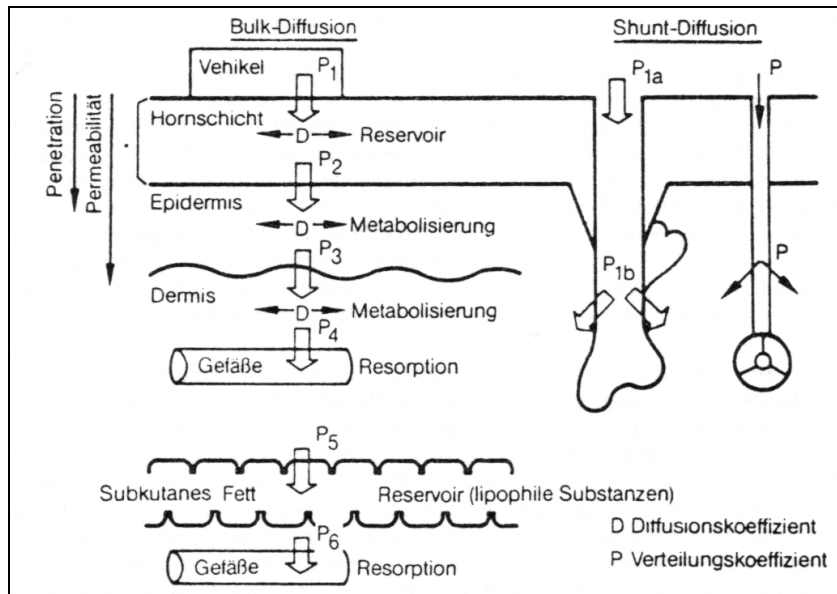


Abbildung 2.3: Permeationsschema durch die Haut (Stüttgen, 1990)

Das Stratum corneum verhindert als Hauptbarriere der Haut weitgehend das Eindringen von Fremdstoffen. Dieses macht sich in der Verzögerungszeit zwischen Arzneistoff-Penetration und pharmakologischer Wirkung bemerkbar (Kranz et al., 1977). Zunächst kann nur gelöster Arzneistoff per Diffusion durch die Trägergrundlage an die Grenzfläche zwischen Vehikel und Haut (Barry, 1983; Grimmes, 1984) und anschließend entlang eines Konzentrationsgefälles über das Stratum corneum in den Organismus gelangen (Scheuplein und Blank, 1972). Ein aktiver Transport konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Loth, 1986). Für lipophile Wirkstoffe ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Übertritt von dem Stratum corneum in hydrophileres darunter liegendes Gewebe (Potts and Guy, 1992).

Der Übergang in die lebenden Teile der Epidermis findet einerseits unter einem Milieuwechsel von lipophil nach hydrophil statt, andererseits besteht hier die Möglichkeit zu Metabolisierung und Depotbildung (Abb. 2.3). Vor allem lipophile Stoffe neigen zur Depotbildung in den lipophilen Schichten des Stratum corneum (Ziegenmeyer, 1986). Ein Öl/Wasser-Verteilungskoeffizient von etwa 1 stellt dafür eine gute Voraussetzung dar (Landmann, 1991). Ist der Arzneistoff in der Dermis mit dessen Gefäßsystem angekommen, kann mit dessen Absorption in den großen Kreislauf ein permanenter Abtransport durch das Blut gewährleistet werden (perfect sink).

Die passive Diffusion des Arzneistoffes durch das Stratum corneum ist auch als transdermale Penetration über die Hautanhangsgebilde möglich. So können Fremdsubstanzen über Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen in den Organismus gelangen. Da diese aber je nach Körperregion nur etwa 0,1-1,0 % der Hautoberfläche einnehmen, wird diese Route beim Menschen für die systemische Therapie als bedeutungslos angesehen. Sie stellt aber dennoch einen zusätzlichen Absorptionsweg für wasser- und öllösliche Substanzen und auch Sterole dar (Grasso, 1971).

Bei der transepidermalen Penetration grenzt man den interzellulären von dem transzellulären Weg ab (Abb. 2.2). Der Wirkstoff kann bei der interzellulären Route durch die lamellaren Lipidschichten des Interzellularraumes zwischen den Korneozyten hindurch diffundieren. Dabei ist sowohl eine Route über die hydrophilen Schichten der polaren Kopfgruppen als auch eine Passage über die lipophilen Schichten möglich. Dieser Weg stellt die häufigste Penetrationsroute dar (Neubert et al., 1996), zumal eine Extraktion der Lipide die Permeabilität steigert, während keratolytische Reagenzien kaum Effekte verursachen (Maltotsy et al., 1968; Harada et al., 1992). So sind Unterschiede in der Zelllagenanzahl und deren Dicke für die Permeation unerheblich, während die Lipidkomposition und -organisation für die Barrierefunktion wichtig sind (Elias, 1981).

Durch optische Methoden konnte die Diffusion verschiedener Substanzen durch die Lamellenstruktur sichtbar gemacht werden (de Haan et al., 1989; Boddé et al., 1991). Die Molekülgröße, das chemische Potential der Stoffe und deren Verteilungskoeffizient zwischen den Grenzphasen haben einen großen Einfluß sowohl auf die Menge als auch auf die Route des Arzneistoffes. Zum Beispiel nehmen Steroide und Alkohole vorwiegend den interzellulären Weg durch das Stratum corneum, was über einen Vergleich der Verteilungskoeffizienten mit den entsprechenden Permeationsdaten bewiesen werden konnte (el Tayar et al., 1991). Die transzelluläre Passage führt sowohl über die Korneozyten als auch über den Interzellularraum und ist deshalb nur für polare Stoffe möglich (Ziegenmeyer, 1986). Wird Hydrocortison allerdings in Cyclodextrine verpackt, so konnte eine überwiegende Shunt-Diffusion aufgrund der veränderten Affinität beobachtet werden (Preiss et al., 1995).

Insgesamt wird die Wirkstoffpermeation durch die Haut neben den physiko-chemischen Eigenschaften des Arzneistoffs wie dessen Konzentration, Freisetzungsverhalten, Verteilungskoeffizient, Eiweißbindung und evtl. Anwesenheit von Enhancern, von individuellen Faktoren wie Hautzustand, Applikationsort, Alter, Durchblutung und Erkrankung bzw. Verletzungen der Haut beeinflusst (Maibach et al., 1971; Ziegenmeyer,

1986; Bonina et al., 1993; Oriba et al., 1996; Rougier et al., 1987). Daneben lässt sich aber in bestimmten Fällen auch durch die Vehikelwahl die Permeationsroute bestimmen (Waranuch et al., 1999). Letztlich beeinflusst die Lipidzusammensetzung die Löslichkeit und Permeabilität des Wirkstoffes, so dass Unterschiede in der Anreicherung und in den Permeationsergebnissen entstehen (Loth et al., 2000). Ein Modell zur Voraussage der Stratum corneum Permeabilität bestimmter Arzneistoffe wird von Potts und Guy (1992) vorgestellt, wobei auch hier hervorgehoben wird, dass der Permeabilitätskoeffizient und der Oktanol/Wasser-Koeffizient von der Art und Menge der Stratum corneum-Lipide abhängen. Nach Higuchi (1960) haben alle Suspensionssalben eines Arzneistoffes, aufgrund der gleichen Arzneistoffkonzentration in der gelösten Phase, dieselbe Penetrationsrate; demnach ist die Passage durch das Stratum corneum der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Zur Berechnung und letztendlich zum Vergleich der erhaltenen Permeationsdaten verschiedener Arzneiformen bzw. unterschiedlicher Formulierungen wird zunächst die pro Zeit- und Flächeneinheit permeierte Arzneistoffmenge als Arzneistoffflux J berechnet. Da perfect-sink-Bedingungen vorausgesetzt werden, lässt sich dieser Massentransport pro Zeit nach folgender Gleichung, die auf dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz basiert, beschreiben:

$$J = \frac{dm}{dt \cdot A} = C_o \cdot D_s \cdot \frac{K}{h} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

J : Arzneistoffflux [$\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$]

dm/dt : Massenfluss

A : Diffusionsfläche [cm^2]

C_o : Anfangskonzentration im Donator [g/cm^3]

D_s : scheinbarer Diffusionskoeffizient in der Haut [cm^2/s]

K : Verteilungskoeffizient Haut/Donator

h : effektive Hautdicke [cm]

Nur schwer beschreiben lassen sich der Verteilungskoeffizient und die effektive Hautdicke, weshalb sie mit dem scheinbaren Diffusionskoeffizienten zum Permeabilitätskoeffizienten [cm/s] zusammengefasst werden:

$$P = D_s \cdot \frac{K}{h} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

Diese beiden Gleichungen vereinfachen sich damit zu

$$J = P \cdot C_o \text{ bzw. } P = \frac{J}{C_o} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Bei Suspensionsformulierungen beträgt die aktive Wirkstoff-Konzentration nicht die Gesamtkonzentration in der Formulierung, sondern lediglich die Konzentration des gelösten Anteils. So geht in die Berechnung des Permeationskoeffizienten für Suspensionsformulierungen, des sogenannten PerSol-Koeffizienten Z [cm/s], die Sättigungslöslichkeit des Wirkstoffes C_s [g/cm³] in der jeweiligen Grundlage ein:

$$Z = \frac{J}{C_s} \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

Damit wird nochmals offensichtlich, dass physikochemische Faktoren wie die Arzneistoffkonzentration und die Wechselwirkungen Arzneistoff/Vehikel (Freisetzungsverhalten), Arzneistoff/Haut (Verteilungskoeffizient, Eiweißbindung) und Vehikel/Haut (Penetrationsförderer, Hydratationsänderung) einen großen Einfluß auf das Permeationsverhalten haben.

2.1.2.4 Permeation durch Keratinozytenkulturen

Permeationsuntersuchungen werden sowohl an Vollhaut als auch an excidiertem Stratum corneum durchgeführt. Zwar sind für Vollhaut-Permeationen gute in-vivo/in-vitro-Korrelationen beschrieben worden (Franz, 1975), allerdings wurde auch eine mögliche Anreicherung von Corticosteroiden und anderen lipophilen Substanzen in den lebenden Bereichen der Epidermis beobachtet, die in vivo nicht bestätigt werden konnte (Zesch und Schäfer, 1975). Bei der Permeation durch excidiertes humanes Stratum corneum muss hingegen beachtet werden, dass, bedingt durch den Versuchsaufbau, das Gewebe stark hydratisiert wird, womit ein möglicher Einfluß auf die Permeabilität nicht ausgeschlossen werden kann. Somit ist nicht nur die Vergleichsmöglichkeit mit den in-vivo-Bedingungen eingeschränkt. Auch interindividuelle Variabilitäten, die verschiedene Spender mit sich bringen, tragen dazu bei, dass letztendlich nur die Permeationsdaten von Stratum corneum eines Probanden miteinander verglichen werden können.

Aus diesem Grund ist die Anzüchtung von Humanhaut in der Zellkultur als sinnvoll anzusehen. Da aber das Stratum corneum dieser Zellkulturen wesentlich dünner als in-vivo ist, erfolgt die Permeation auch schneller und in höherem Maße. Nach Schmook et al. (2001) permeieren lipophile Substanzen durch Zellkulturen mit einem höheren Flux. Das wird als ungünstige Voraussetzung für einen Vergleich mit Stratum corneum bewertet. Allerdings stimmen im Permeationsvergleich die Rangfolgen der Arzneistoffe aus verschiedenen Formulierungen in der Regel mit den Ergebnissen aus Stratum corneum-Permeationen überein (Specht, 1999).

Zudem ist die Permeation durch die Zellkulturen hinsichtlich der Metabolisierung interessant, da diese im wesentlichen in den lebenden Teilen der Epidermis und Dermis stattfindet (Kubota et al., 1993). Von einer Metabolisierung durch excidiertes humanes Stratum corneum wurde hingegen bisher noch nicht berichtet.

2.1.2.5 Metabolisierung in der Haut

Schon auf der Hautfläche besteht die theoretische Möglichkeit der Metabolisierung der Arzneistoffe durch die Bakterien der Hautflora. Zudem besitzen die lebenden Hautschichten eine Metabolisierungsaktivität, die auf 2% der Leberaktivität geschätzt wird (Niedner und Ziegenmeyer, 1992), wobei die Epidermis metabolisch aktiver ist als die Dermis.

Vor allem der Einsatz von Prodrugs nutzt die Möglichkeit aus, den Arzneistoff vor Ort aktivieren zu können. So finden häufig Ester von Glucocorticoiden Anwendung, die aufgrund der höheren Lipophilie besser durch die Haut permeieren und dann in der Epidermis oder Dermis zum eigentlichen Wirkstoff abgebaut werden (Feldmann und Maibach, 1969).

2.1.2.6 Physikochemische Eigenschaften des Stratum corneum und dessen Lipide

Die Organisation des Stratum corneum und hier vor allem dessen Lipide war Gegenstand verschiedenster Untersuchungsmethoden. An dieser Stelle soll eine kurze Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse gegeben werden.

Zur Visualisierung der Lipidmatrix konnte über eine Rutheniumfixierung der interzellulären Lipidlamellen die Struktur der oberen Schichten des Stratum corneum angefärbt werden (Schwartzendruber et al., 1989; Madison et al., 1987). Sie besteht aus Bilayern, die im elektronenmikroskopischen Bild alternierende dunkle und helle Banden mit unterschiedlicher Dicke bilden. Die Anzahl der Bilayer variiert dabei (Elias et al., 1977; Schwartzendruber et

al., 1989). In einigen Bereichen fehlen diese Bilayer-Strukturen, was mit einem direkten Kontakt der Korneozyten über den cornified envelope erklärt wird (Wertz et al., 1989a). Im Stratum compactum sind zusätzlich Unterbrechungen der Lipidschichten durch Desmosomen zusammen mit amorphem Material und im Stratum disjunctum häufig eine Aufweitung durch Desmosomenreste erkennbar (Hou et al., 1991).

Röntgenuntersuchungen von humanem Stratum corneum bestätigen den lamellenartigen Aufbau des Interzellularraumes, der nach Behandlung mit Natriumdodecylsulfat zerstört wird (Hatta et al., 2001). Der interlamellare Abstand der Lipidmatrix wird mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelbeugung auf 6,4 nm angegeben (Bouwstra et al. 1991a). Zusätzlich wurde eine zwei Bilayer umfassende „repeating unit“ mit einem Netzebenenabstand von 13 nm beobachtet, was durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden konnte (Bouwstra, 1997; Cornwell et al., 1994). Daraus ergibt sich ein Muster, das als weit-nah-weit beschrieben wurde (Kuempel et al., 1998). Eine weitere Interferenz von 18,8 nm wurde Cholesterol-Kristallen zugeordnet. Nach Temperaturerhöhung und Rekristallisierung war die erste Interferenz von 6,4 nm nicht mehr detektierbar, während die zweite Interferenz von 13 nm weiterhin bestand. Daraus wird geschlossen, dass der Bereich von 6,4 nm vor allem aus ungesättigter Linolensäure, Ceramid 5 und Cholesterol besteht (Bouwstra et al., 2000).

Röntgenweitwinkeluntersuchungen können eine Aussage über die Nahordnung der Moleküle zueinander machen. Es lassen sich bei der Messung von hydratisiertem humanen Stratum corneum zuverlässig scharfe Interferenzen bei etwa 0,37 nm und 0,41 nm messen (Bouwstra et al., 1992a und 1997; Cornwell et al., 1994). Beide Interferenzen können mit einer orthorhombischen senkrechten Anordnung der Lipide erklärt werden, wobei die Interferenz bei 0,412 nm zusätzlich auf eine Gelphase mit hexagonaler lateraler Anordnung schließen lässt. Außerdem gilt für diese Interferenz eine Beteiligung im cornified envelope, da sie nach einer Lipidextraktion mit Methanol/Chloroform nur abgeschwächt vorhanden ist. Die detektierten Interferenzringe zeigen Anisotropie, was auf eine parallele Orientierung zur Oberfläche des Stratum corneum hindeutet. Über FTIR-Messungen konnte die Vermutung bestätigt werden, dass hexagonale neben orthorhombisch angeordneten Verbänden vorliegen, da bei Hauttemperatur dicht gepackte trans- und bewegliche gauche-Konformere gefunden wurden (Ongpipattankul et al., 1994). Daneben treten Interferenzen bei 0,96 nm und 0,46 nm auf, die auf die Anwesenheit von Keratin zurückgeführt werden (Garson et al., 1991; Bouwstra et al., 1992a). Zusätzliche Interferenzen von phasenseparierten Cholesterolkristallen liegen bei 0,485 nm und 0,571 nm (Bouwstra et al., 1992), wobei diese interkalierend in den Lamellen angeordnet sein sollen (Bouwstra et al., 1997).

Eine Temperaturerhöhung führt zu einem Verschwinden der orthorhombischen Struktur mit der Interferenz bei 0,37 nm, wohingegen die Interferenz bei 0,41 nm eher noch stärker wird. Daher wird eine Umwandlung der orthorhombischen in die hexagonale Struktur angenommen (Wilkes et al. 1973; Bouwstra et al. 1991b; Pilgram et al., 1999). Vermutlich findet diese Umwandlung ohne Vergrößerung des Neigungswinkels der Ketten in Bezug auf die Netzebene statt, da diese sich während der Temperaturerhöhung nicht veränderte. Bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung verschwinden die Interferenzen der Lamellarstruktur ab etwa 60 °C, während die Intensität der Interferenz bei etwa 0,41 nm erst ab etwa 90 °C abnimmt. Die Interferenzen, die auf das Cholesterol zurückgeführt worden sind, verschwinden bei etwa 90 °C, während diejenigen, die für Keratin stehen, temperaturstabil erhalten bleiben. So ist die Nahordnung der Lipide, im Gegensatz zu der Fernordnung, über einen größeren Temperaturbereich konstant (Bouwstra et al., 1992a).

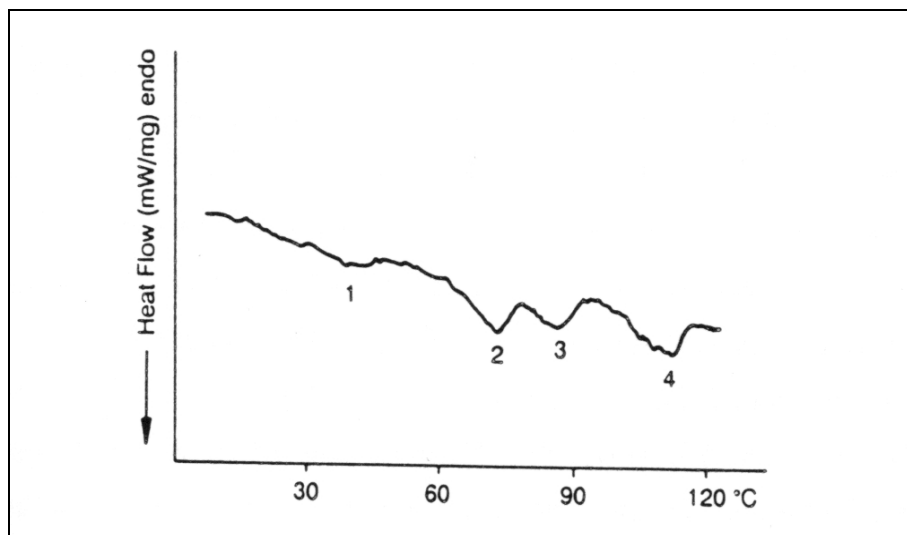


Abbildung 2.4: DSC-Thermogramm von humanem Stratum corneum (Bouwstra, 1993)

Mit der kalorimetrischen Untersuchung von humanem Stratum corneum (per DSC) konnte der Aufbau des Interzellularraumes über die einzelnen Phasenübergänge der Lipide bestätigt werden. Ein typisches Thermogramm zeigt im wesentlichen vier Übergänge, die in Abhängigkeit vom Spender, der Körperregion und vom Wassergehalt der Probe auftreten (Abb. 2.4). Der erste Peak T1 bei etwa 30-40 °C wird einer Umwandlung der lateralen orthorhombischen Anordnung in eine hexagonale Packung zugeordnet. Dieser Peak ist nur selten detektierbar, da er eine geringe Umwandlungsenthalpie besitzt (Bouwstra et al., 1991b). Der zweite Peak T2 bei etwa 70 °C steht für eine allgemeine Umordnung innerhalb der

Lamellen oder eine Umwandlung der lateral hexagonalen Packung der Lipide in die flüssige Phase. Bei 80 °C entsteht ein weiterer Peak T3 als Umwandlungstemperatur von Lipiden, die mit Proteinen des „cornified envelope“ assoziiert sind. Der letzte Peak T4 bei 105 °C entsteht durch die Denaturierung der Proteinstrukturen innerhalb der Korneozyten und ist zudem nur bei einem Wassergehalt des Stratum corneum von über 20% existent (van Duzee, 1975; Knutson et al., 1985; Golden et al., 1987a). Die beiden ersten Peaks T1 und T2 sind reversibel, während T3 nur reversibel ist, wenn zuvor die Temperatur nicht über die Denaturierungstemperatur der Proteine erhöht worden war (van Duzee, 1975). In einigen Fällen konnte ein zusätzlicher Peak bei 55 °C beobachtet werden, der auf einen Verlust des orthorhombischen Gitters zurückgeführt wird (Gay et al., 1994). Ein weiterer Peak bei –9 °C wurde ebenfalls reinen Lipiden zugesprochen (Tanojo et al., 1994).

Mit zunehmendem Wassergehalt bis 20 % wird der Peak T1 zu höheren Umwandlungstemperaturen verschoben (van Duzee 1975; Gay et al., 1994). Die beiden Peaks T2 und T3 erscheinen bei um 5-10 °C tieferen Temperaturen, wenn sich der Wassergehalt im Gewebe bis auf einen Wert von etwa 30 % erhöht (Knutson et al., 1985; Gay et al., 1994). Daher könnte man von einer Fluidisierung der Lipide durch Wasser ausgehen, bei der die hydrophoben Bereiche weniger geordnet sind. Dieses steht im Gegensatz zu den Röntgenweitwinkeldaten, die mit zunehmendem Wassergehalt im Stratum corneum keine Veränderung der Netzebenenabstände ergaben. Aus diesem Grund geht man von einer lateralen Quellung der Lipide aus, die durch eine Erhöhung der interfazialen Oberfläche hervorgerufen wird. Bei Einlagerung des Wassers in die Bereiche der Kopfgruppen kommt es zu einer Verkürzung der Alkylketten, so dass sich die Netzebenenabstände insgesamt nicht verändern (Bouwstra, 1991b).

2.1.2.7 Strukturveränderungen des Stratum corneum durch Wechselwirkungen mit Vehikelkomponenten

Führen Wechselwirkungen von Vehikelkomponenten mit Stratum corneum Bestandteilen zu einer Veränderung deren Konformation, so kann daraus einerseits ein permeationsfördernder, aber auch ein permeationshemmender Effekt resultieren. Da häufig ein für die Therapie zu geringer Arzneistoffanteil transdermal in den Organismus gelangt, lässt sich durch Zusatz eines Enhancers (entspricht Penetrationsverbesserer) diese Arzneistoffmenge stark erhöhen. Für die Permeationsverbesserung sind einige Beispiele bekannt. Der gegenteilige Effekt entspräche einem Retardierer (entspricht Penetrationsverzögerer) und wird theoretisch durch

eine Erhöhung der Ordnung innerhalb der Bilayer erreicht. Damit sollte es möglich sein, Arzneistoffe im Stratum corneum anzureichern bzw. die systemische Penetration zu unterbinden. Hierzu sind bisher nur sehr wenige Studien durchgeführt worden.

Die Einteilung und die verschiedenen Wirkmechanismen möglicher Enhancer waren Gegenstand einiger Studien und Überlegungen. So teilten Hori et al. (1990) Enhancer in zwei Gruppen ein, wobei die Kombination zweier Stoffe aus den beiden Gruppen effizienter sein sollte als ein Vertreter allein. Die Zerstörung der Bilayer-Ordnung wird als ein wesentlicher Mechanismus der Enhancer angeführt (Suhonen et al., 1999) und so wurden mit dem Lipid-Protein-Partitioning (LPP) concept von Barry (1987 und 2001), Enhancer über ihre Wirkungsweise eingeteilt.

Zum einen gibt es Enhancer, die die Lipidorganisation im Stratum corneum zerstören (z.B. Azone, Terpene, Fettsäuren, DMSO, Alkohole) und zum anderen solche Enhancer, die mit dem Keratin interagieren, indem sie die Proteinketten aufweiten und permeabler machen (Abb. 2.5). So können topisch applizierte Vehikelkomponenten einen Teil der Proteine in den Korneozyten extrahieren und somit die Porosität des Stratum corneum erhöhen. Pyrrolidonderivate, Dimethylsulfoxid und Natriumdodecylsulfat können durch Wechselwirkungen mit dem Keratin die Permeationsfähigkeit des Stratum corneum erhöhen (Barry, 1993). Zur dritten Gruppe der Enhancer gehören jene, die die Löslichkeitseigenschaften der Hornschicht verändern, wie z.B. Ethanol. Dabei können einzelne Stoffe nicht nur einer Gruppe, sondern durchaus auch mehreren Gruppen, zugeordnet werden.

Eine Wechselwirkung mit topisch applizierten Stoffen und den Bestandteilen des Stratum corneum ist in Abhängigkeit von deren Affinität grundsätzlich über eine Interaktion mit polaren Kopfgruppen (polare Moleküle), den Einbau in lipophile Bereiche der Bilayer (unpolare Moleküle) und über Wechselwirkungen sowohl polarer Kopfgruppen als auch lipophiler Lipidreste (amphiphile Moleküle) denkbar (Barry, 1993). Grundsätzlich gilt aber, dass ein Enhancer immer im Zusammenhang sowohl mit dem Vehikel als auch dem Wirkstoff zu sehen ist.

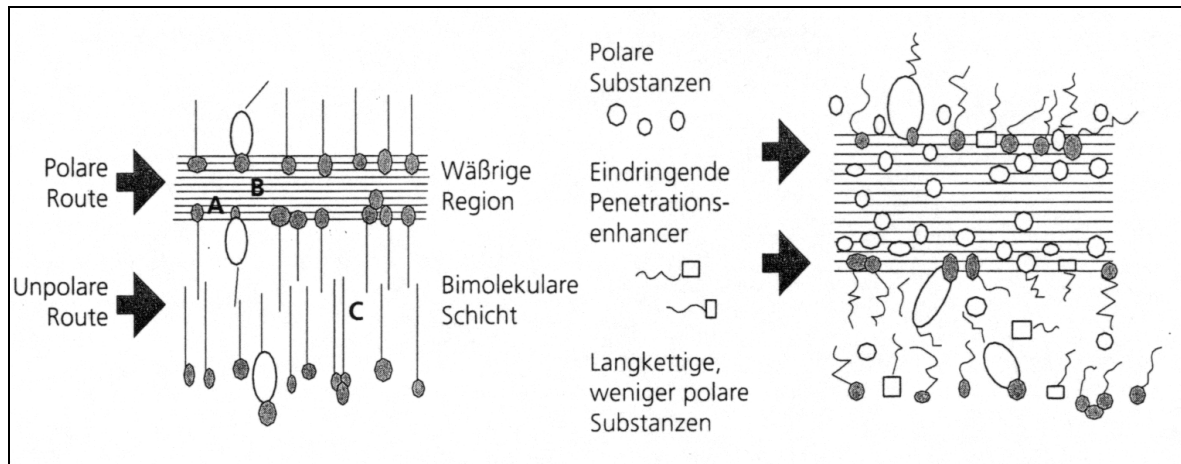


Abbildung 2.5: Verschiedene Routen und Wirkmechanismen der Enhancer (Neubert et al., 2001)

So permeiert Sudanrot nach Vorbehandlung des Stratum corneum mit Isopropylmyristat und PEG 400 sehr gut, während Methylenblau eine schlechtere Permeation erfährt (Rosado und Rodrigues, 2003). Damit lässt sich eine permeationsfördernde Substanz nicht für jeden beliebigen Wirkstoff einsetzen (Niedner, 1993). Da bereits einige Studien mit den unterschiedlichsten Substanzen als möglichen Enhancern durchgeführt worden sind, werden im Folgenden die wichtigsten Gruppen und deren mögliche Wirkmechanismen vorgestellt.

Wasser, der am meisten eingesetzte Hilfsstoff, wirkt durch eine Erhöhung des Hydratationszustandes der Haut (Niedner und Ziegenmeyer, 1992; Barry 1983). In einer Studie konnten Cremes mit steigendem Wasseranteil die Permeabilität für Benzocain erhöhen (Tiemessen et al., 1988). Es wurde bei den Permeationen beobachtet, dass sich Wasserflux und Lipidordnung invers zueinander verhalten (Golden et al., 1987a). Eine Wasseraufnahme bewirken Proteine und interzelluläre Lipide. Die Lipid-Komposition ist hierbei unerheblich (Potts und Francoer, 1991) (Abb. 2.6). Zudem kann Wasser, und auch Dimethylsulfoxid, Interaktionen im Bereich der Lipidkopfgruppen eingehen und diese sogar solvatisieren (Allenby et al., 1969; Toutou, 1988). Insgesamt verringern sich die intermolekularen Kräfte. Dieses bewirkt eine Änderung der Packungsordnung in diesen Bereichen und gleichzeitig eine Volumenzunahme an nicht chemisch gebundenem Wasser. Damit erhöht sich dann der laterale Abstand zwischen den Lipiden und führt zu einer gesteigerten Beweglichkeit. Auch unpolare Moleküle können davon profitieren, da durch die Fluidisierung der Lipide der Diffusionswiderstand innerhalb der lipophilen Bereiche reduziert wird (Montes et al., 1967; Barry, 1987; Mak et al., 1991).

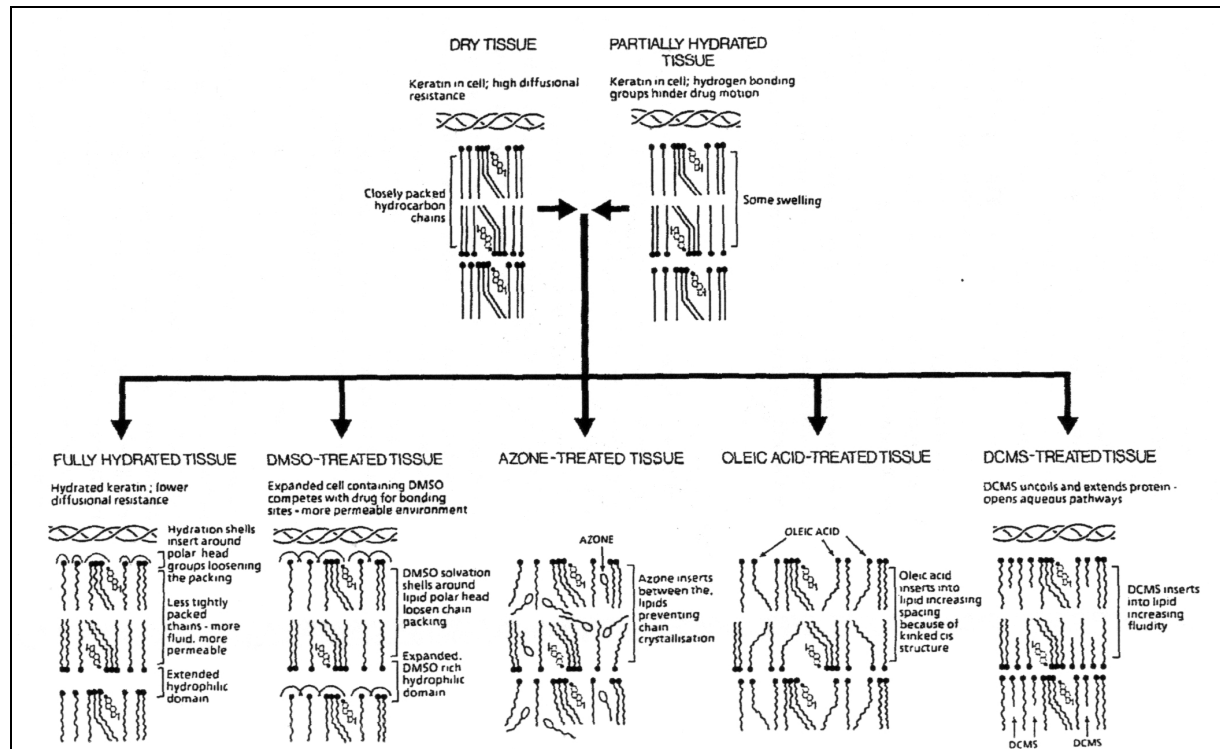


Abbildung 2.6: Wirkmechanismen verschiedener Enhancer auf die Lipidmatrix und Keratin (Barry, 1988)

Nach Hydratisierung des Stratum corneum wurde keine Veränderung des Netzebenenabstandes festgestellt, was im Sinne einer lateralen Umordnung der Lipide interpretiert wurde (Bouwstra et al., 1991a). Daneben wird das Ausbleiben der Interferenz von 13,4 nm nach Hydratisierung als möglicher Grund für die permeationsfördernde Wirkung von Wasser diskutiert. Die interlamellaren Abstände und auch die laterale Packung der Lipide bleiben durch unterschiedliche Hydratationsgrade des Stratum corneum unbeeinflusst (Mak et al., 1991; Cornwell et al., 1994; Bouwstra, 1997; Bouwstra et al., 1991b). Lipidgrundlagen, wie Vaseline, wirken über eine Okklusion und können so ebenfalls eine Erhöhung der Hydratation bewirken (Barry, 1983).

Um mit den lipophilen Resten der Lipide interagieren zu können, sind lipophile Enhancer nötig, wie beispielsweise Azon[®]-Derivate, Terpene (Cornwell et al. 1994) oder Fettsäuren (Golden et al., 1987b; Aungst et al. 1986), die nun näher erläutert werden.

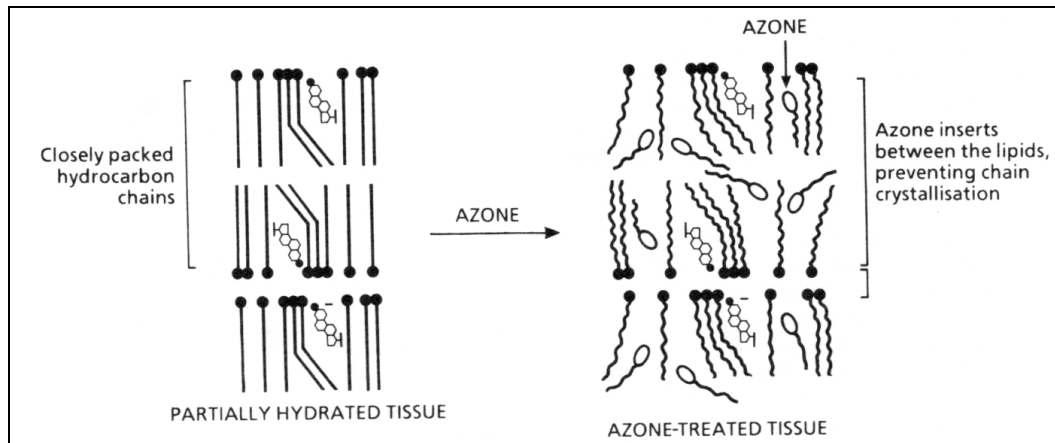


Abbildung 2.7: Wirkmechanismus von Azon[®] (Barry, 1991)

Es wurde ermittelt, dass Alkylazone von einer Kettenlänge mit mehr als 6 C-Atomen eine Unordnung in den Lamellarphasen verursachen (Abb. 2.7) und auf diese Weise die Stratum corneum Permeabilität verändern (Bouwstra et al., 1992). Azon[®] mit einer C₁₂-Kette erreicht die Dimensionen des Cholesterols und verringert so zusätzlich Cholesterol-Wechselwirkungen (Neubert et al., 2001). Da Azon[®]-Derivate in der Regel in Propylenglykol gelöst werden, konnte man in diesem Zusammenhang auch für Propylenglykol allein eine Interaktion mit den Lipiden nachweisen, was zwar kalorimetrisch, aber nicht über die Röntgenkleinwinkelbeugung bestätigt werden konnte (Bouwstra et al., 1992b). Wasser und Propylenglykol interagieren demnach mit den Stratum corneum Lipiden, allerdings bleibt die 6,4 nm Interferenz davon unbeeinflusst. Sie interkalieren nach Bouwstra et al. (1991b) nicht, sondern werden in die hydrophilen Schichten eingebaut. Im Röntgenweitwinkelbereich konnte beobachtet werden, dass Oleyl- und Dodecylazon keine Umwandlung der orthorhombischen in hexagonal gepackte Lipide induzieren, während Propylenglykol den größten Teil der orthorhombisch geordneten Lipide belässt und nur einen kleinen Teil in die hexagonale Ordnung transformiert (Pilgram et al., 2000). Für die Kombination mit Azon[®]-Derivaten gilt: Je länger die Kettenlänge ist, desto stärker die Interaktionen in dem Lipidraum. Neben der Beeinflussung des Stratum corneum ist eine Umstrukturierung der Formulierung durch Zugabe von Azon[®]-Derivaten möglich. In einer Emulsion reicherte sich Hydrocortison in Azon[®]-reichen Gebieten an, woraufhin seine Konzentration in der wässrigen Phase absank und der permeationsfördernde Effekt für Hydrocortison insgesamt hinfällig wurde.

Terpene alleine verursachen laut Cornwell et al. (1994) keine Zerstörung der Lipidstruktur. In Kombination mit Propylenglykol kam es insofern zu einer Veränderung, als das Propylenglykol neben der Solvatisierung und Erweiterung von Keratinstrukturen zu einer

Umstrukturierung der Lipidbilayer führte. Desweiteren senkte Propylenglykol in Kombination mit Terpenen sogar additiv die Umwandlungstemperaturen von T2 und T3. Da aber Röntgenkleinwinkeluntersuchungen mit Propylenglykol keine Veränderungen zeigten, wird Propylenglykol nur in Kombination mit Terpenen ein Effekt auf die Lipidlayer zugeschrieben (Cornwell et al, 1996). Als lipophiler Arzneistoff permeierte Hydrocortison in Gegenwart von Terpenen besser, vor allem bei Verwendung des lipophilsten Vertreters der getesteten Substanzen, dem Nerolidiol (Kattan et al., 2001 und 2000).

Einfach ungesättigte cis-Fettsäuren sind in der Lage die Fluidität der Stratum corneum Lipide zu erhöhen. Dieses konnte spektrometrisch und kalorimetrisch erfasst werden (Golden et al., 1987b). Dabei wurde ermittelt, dass geradzahlige langkettige Fettsäuren eine Affinität zu den Stratum corneum-Lipiden haben (Tanojo et al., 1997). So beeinflusst Ölsäure die Lipide in der Weise, dass Piroxicam in seiner Permeation gefördert wird. In Kombination mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch konnte Ölsäure eine zusätzlich enhancende Wirkung auf die Permeation von lipophilen Arzneistoffen hervorrufen (Kim et al., 1996). Die Daten sprechen für eine Separierung der flüssigen Lipide (Francoer et al., 1990) bzw. eine Einlagerung flüssiger Ölsäure-Kanäle (Walker und Hadgraft, 1991). Eine Studie von Aungst (1989) beschäftigte sich mit dem Permeationsverhalten von Naloxon aus Propylenglykol kombiniert mit verschiedenen Fettsäuren. Am besten erwiesen sich dabei Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₉-C₁₂, wobei es keinen Unterschied bezüglich der Verzweigung und Konformation der Doppelbindungen gab. Allerdings schnitten ungesättigte Fettsäuren besser als gesättigte ab (Chantasart et al., 2004). Zudem konnte keine Korrelation zwischen irritativen und permeationsfördernden Eigenschaften gefunden werden. Bei der Weiterführung dieser Thematik wurde festgestellt, dass Fettsäuren durch eine bessere Wirkstofflöslichkeit im Vehikel eine gesteigerte Verteilung und Lösungspenetration hervorrufen, während die Barriereigenschaften des Stratum corneum nachlassen. Damit wird die verbesserte Permeation durch den Zusatz an Fettsäuren verständlich (Aungst et al., 1990). In einer Arbeit von Funke et al. (2002) konnte der Kombination von Propylenglykol und Laurinsäure ein synergistischer Effekt auf die Permeation von Antiöstrogenen nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Fluidisierung der Lipidmatrix im Stratum corneum festgestellt. Die Anwesenheit von Fettsäuren steigert die Aufnahme von Propylenglykol, das oft als Träger oder weiterer Hilfsstoff in der Formulierung anwesend ist, in das Stratum corneum. Dort löst Propylenglykol α -Keratin, besetzt Wasserstoffbrückenbindungen an Proteinen und lockert die Lipidpackung über die polaren Kopfgruppen. Es resultiert eine Akkumulation im Stratum

corneum. Insgesamt ermöglichen geradzahlige Fettsäuren mit einer langen Kette den Propylenglykol-Eintritt in die Korneozyten.

Nichtionische Emulgatoren vom Polyoxyethylentyp können mit einer Ethylenoxidentkette von 6-14 Einheiten den Flux von Methylnicotinat erhöhen, indem sie die Fluidität der Lipidmatrix und auch den der intrazellulären Matrix verändern (Walters et al., 1988). So wurden eine ganze Reihe von verschiedenen nichtionischen Emulgatoren getestet und eine Erhöhung der Permeation von Salicylsäure beobachtet (Shen et al., 1976). Als ein Erklärungsansatz gilt hier die Penetration und teilweise Bindung dieser Substanzen in Keratin-Strukturen, so dass Strukturveränderungen angenommen werden können (Breuer, 1979).

Zur Verbesserung des Hydratationszustandes des Stratum corneum wird Harnstoff häufig als Wirk- oder Hilfsstoff in der Dermatologie eingesetzt. In Gegenwart von 10 % Urea konnte eine Permeationssteigerung von Hydrocortison erzielt werden. Dieses wurde neben einer erhöhten Liberation des Arzneistoffes aus der Formulierung auch auf eine gesteigerte Wasserbindungskapazität der Haut zurückgeführt (Wohlrab et al., 1989 und 1990). Auf die Permeation von Hydrocortisonacetat in Poloxamergel 407 wirkt Urea hingegen über eine Aufweitung der hydratisierten Keratinstrukturen als Retardierer (Bentley et al., 1997).

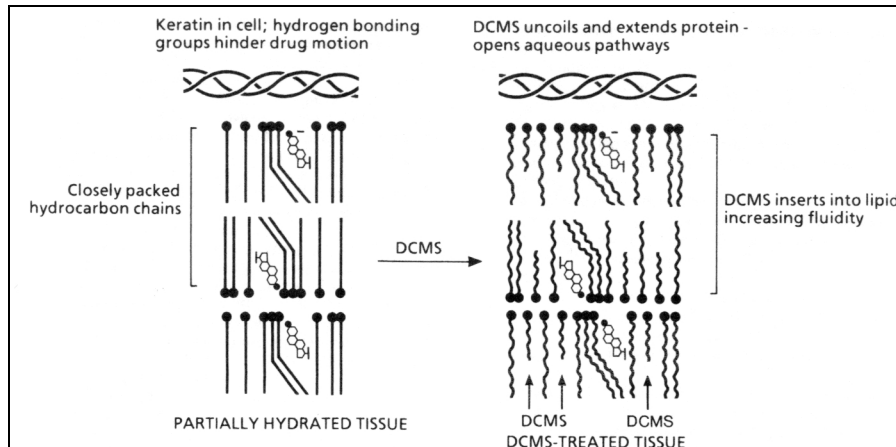


Abbildung 2.8: Wirkmechanismus von Dimethylsulfoxid (Barry, 1991)

Wie in Abb. 2.8 dargestellt, interagiert auch Dimethylsulfoxid als meist verwendetes Sulfoxidderivat mit Korneozytenbestandteilen (Barry 1993) und verbessert durch seine Anwesenheit in der Lipidmatrix die Löslichkeit von Arzneistoffen (Barry 1987 und 1991; Walker and Smith, 1996).

Lipidlösliche Alkohole penetrieren über den Lipidweg. Eine Temperaturerhöhung führt zusätzlich zu einer niedrigeren Aktivierungsenergie und damit schnelleren Diffusion durch

das Stratum corneum (Scheuplein und Blank, 1972). Solche Mechanismen wurden ebenfalls für Ethanol und andere Alkohole beschrieben (Barry 1991).

Zum Nachweis der Wechselwirkungen von Vehikelkomponenten mit den Bestandteilen des Stratum corneum können zum einen thermoanalytische Untersuchungen dienen. Hierbei wird ein Shift der Umwandlungstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen als Hinweis auf eine veränderte Ordnung innerhalb des Interzellularraumes gewertet (Barry, 1991; Golden et al., 1987a). Eine Aufweitung im Nah- und Fernbereich der Molekülverbände lässt sich zuverlässig mit Röntgenweitwinkel- bzw. Röntgenkleinwinkelbeugung nachweisen. Neben einer Fluidisierung sollte auch immer eine Extraktion von Lipidbestandteilen in Betracht gezogen werden. Dieses lässt sich über Dünnschichtchromatographie nachweisen. Eine Zerstörung der Ordnung im Interzellularbereich führt nicht nur zu einer erhöhten Permeabilität in den Organismus, sondern prinzipiell auch für den Weg aus dem Organismus in die Umwelt. So wird der transepidermale Wasserverlust als Indikator für eine erniedrigte Barrierefunktion des Stratum corneum herangezogen (Aalto-Korte, 1995; Aalto-Korte and Turpeinen, 1995; Lehmann et al., 2001). Daneben wurde in früheren Studien häufig der Skin Blanching Test durchgeführt, bei dem die vasokonstriktorische und damit hautaufhellende Wirkung nach der Behandlung mit Corticosteroiden vermessen wird (Lehmann et al., 2001; Malzfeld et al. 1989; Niedner, 1993; Schäfer-Korting et al., 1993). Letztlich gibt aber nur eine Permeationsstudie Auskunft über das Ausmaß der Veränderung der Barrierefunktion.

2.2 Arzneistoffe

Wegen ihrer antiphlogistischen und antiproliferativen Wirkung bilden die Glucocorticoide eine der wichtigsten Arzneistoff-Gruppen zur Behandlung dermalen Erkrankungen. Auch die immunsuppressive, antipruriginöse und vasokonstriktorische Wirkung trägt zum therapeutischen Effekt bei. In der vorliegenden Arbeit wurden Formulierungen mit Hydrocortison und Prednicarbat untersucht. Diese beiden Arzneistoffe werden im Folgenden näher beschrieben.

2.2.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen von Hydrocortison und dessen Weiterentwicklungen

Hydrocortison ist ein endogenes Hormon, welches 1936 von Mason, Myers und Kendall zum ersten Mal beschrieben wurde (Abb. 2.9). Dieses Glucocortikoid zeigt bei dermalen

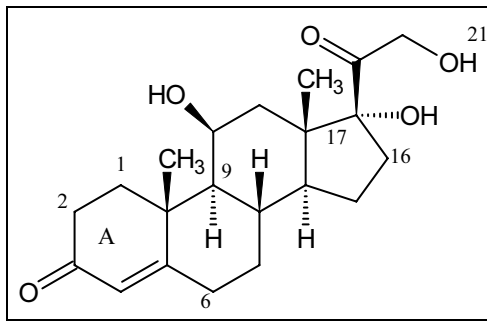


Abbildung 2.9: Strukturformel von Hydrocortison

Anwendung antiphlogistische, immunsuppressive, vasokonstriktische und schwach antiproliferative Wirkung. Auf molekularer Ebene im Zellkern führt ein aktivierter Komplex aus dem Hormon mit einem intrazellulären Rezeptor und einem Akzeptor zu einer gesteigerten Synthese zunächst von m-RNA und dann von Proteinen. Zur antiphlogistischen Wirkung wird die Synthese des Proteins Lipomodulin induziert, das die Phospholipase A hemmt und so in den Arachidonstoffwechsel eingreift, so dass die Synthese von Entzündungs- und Schmerzmediatoren verhindert wird.

Nach Miller und Munro (1980) klassifiziert, gehört Hydrocortison zu den Glucocorticoiden mit schwacher Wirkung (Klasse IV). Damit ist es bei nicht infizierten Ekzemen, Psoriasis, Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Lichtdermatosen und Prurigoerkrankungen indiziert. Zu den Nebenwirkungen zählen vor allem Hautatrophie und Striae, die sich in der antiproliferierenden Wirkung begründen, aber auch Teleangiektasien, welche durch die Dilatation dermalen Blutgefäße hervorgerufen werden, Pigmentverschiebungen und Steroidakne. Bei dem Einsatz hoch wirksamer Glucocorticoide, großflächiger Anwendung oder einem Okklusivverband ist außerdem mit einer systemischen Absorption zu rechnen, zumal es sich häufig um geschädigte Haut mit geringem Barrierschutz handelt. Zur Vermeidung systemischer Nebenwirkungen wird deshalb immer die geringst mögliche Wirkstärke und eventuell eine Intervalltherapie mit der kortikoidfreien Grundlage, zur Vermeidung der Störung des circadianen Regelkreises, oder die Zugabe von Retinsäure zur gleichzeitigen Steigerung der Proliferation empfohlen.

Nach der Permeation findet sich Hydrocortison in der Epidermis und in der Dermis wieder (Hueber et al., 1992), wobei die Gesamtkonzentration an Lipiden ein kritischer Faktor für die perkutane Absorption ist (Barry, 1983). Demnach nehmen Steroide und Alkohole vorwiegend den interzellulären Weg durch das Stratum corneum. Mit einem Vergleich der Verteilungskoeffizienten und den entsprechenden Permeationsdaten konnte dieser

Zusammenhang bewiesen werden (el Tayar et al., 1991). Barry und Bennett (1987) sprechen dem Hydrocortison aus diesem Grunde eine vornehmlich lipophile Route durch den interzellularen Lamellarraum zu. Zudem akkumuliert Hydrocortison in den oberen Schichten des Stratum corneum, wobei vor allem die Sebozyten als Drugreservoir fungieren. Hautanhänge wie Haare und Drüsen erhöhen die Hydrocortison-Permeation.

Vor dem Hintergrund ausreichender Arzneimittelsicherheitsdaten und des Selbstbehandlungsbedarfs kleinerer Ekzeme sind in Deutschland seit dem 1. Juli 1996 Hydrocortison-Topika mit einem Wirkstoffgehalt von maximal 0,25 % und einer Packungsgröße bis zu 50 g aus der Verschreibungspflicht entlassen worden (Vogt, 1997).

2.2.2 Weiterentwicklungen des Hydrocortisons

Durch die Weiterentwicklung von Hydrocortison auf der Basis von Struktur-Wirkungsbeziehungen sollte die Wirkstärke sowie die Permeationsmenge durch die Haut gesteigert und gleichzeitig von der unerwünschten Atrophie abgekoppelt werden.

Veränderungen am Steroidgerüst lassen sich grundsätzlich in reversible, die durch den Metabolismus im Organismus wieder rückgängig gemacht werden, und irreversible, die auch nach dem Abbau verbleiben, unterscheiden. Zu den reversiblen Modifizierungen am Steroidmolekül gehören die Veresterungen der Hydroxyl-Gruppen, die lediglich eine Veränderung der Pharmakokinetik bewirken. Wenn aber das Gerüst mit Methyl- oder Ethylgruppen verestert wird, dann bedeutet dieses eine irreversible Veränderung und damit eine andere zu erwartende Pharmakodynamik.

Für die glucocorticoide Wirkung ist eine α -Ketol-Gruppe am C₁₇, eine α , β - (4,5) ungesättigte Keto-Gruppe am C₃ (Ring A) und eine Sauerstoff-Funktion am C₁₁ essentiell. Die Doppelbindung zwischen C₁ und C₂ im Ring A steigert die antiphlogistische Wirkung um das Vierfache (Mutschler, 1996). Im Allgemeinen sind 17-Desoxycorticoide lipophiler und damit für die Haut besser permeabel. Eine weitere Erhöhung der Lipophilie kann durch eine zusätzliche Veresterung am C₂₁ erreicht werden. Allerdings hat dieses auch einen pharmakologischen Aspekt: eine Veresterung am C₁₇ erhöht die Rezeptoraffinität, während die Veresterung am C₂₁ diese Affinität zunichte macht. Damit kann gerade diese Veresterung im Sinne des Prodrug-Prinzips fungieren (Roth und Fenner, 1997).

Insgesamt steht bei der Weiterentwicklung der Glucocorticoide die Trennung der antiphlogistischen von der unerwünschten antiproliferativen Wirkung im Vordergrund und,

im Gegensatz zur früheren Forschung, nicht mehr die Steigerung der gesamten Potenz des Arzneistoffes.

2.2.3 Der Arzneistoff Prednicarbat

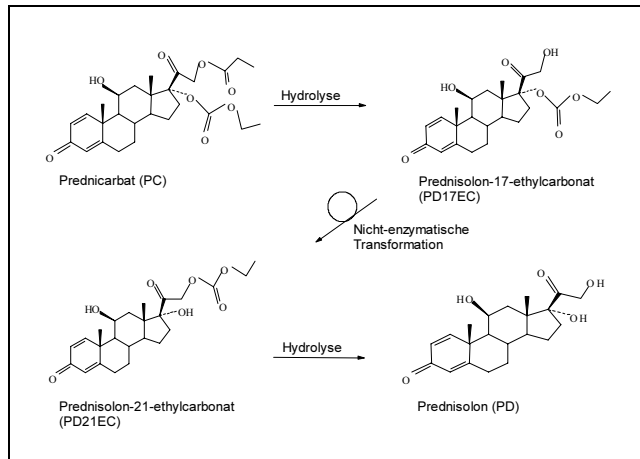


Abbildung 2.10: Strukturformeln von Prednicarbat und seinen Metaboliten (Gysler, 1998)

Prednicarbat gehört als topisches Glucocorticoid der 4. Generation zur Wirkstärke II, in der alle stark wirksamen Substanzen zusammengefasst sind. Es vereint in sich das Prodrug- und Soft-Drug-Prinzip, das heißt, es wird durch Metabolisierung in der Haut giftig und im weiteren Verlauf zu inaktiven Metaboliten, die den Körper systemisch nicht weiter belasten, abgebaut. So passiert dieser Doppellester die Haut und wird durch enzymatische Spaltung in der 21-Position aktiviert. Das 17-Monoester-Derivat hat eine 3 bis 10-fach höhere Rezeptoraffinität als die Muttersubstanz. Nach Transformation zum Prednisolon-21-ethylcarbonat verläuft der weitere Abbau zum relativ schwachen Prednisolon langsamer (Abb. 2.10).

Prednicarbat hat als Doppellester ein geringeres Atrophierisiko im Vergleich zum 17-Monoester. Außerdem ist nach dermalen Anwendung im Blut keine Urschubstanz nachgewiesen worden. Dadurch bleibt der endogene Cortisolspiegel unbeeinflusst. Zellkulturen reagierten auf Prednicarbat in der Weise, dass nur bei hohen Prednicarbat-Konzentrationen eine Supprimierung der Vitalität und Migrationsfähigkeit humaner Fibroblasten festgestellt wurde (Hein et al., 1988). Hinsichtlich der Metabolisierungsgeschwindigkeit in Fibroblasten- und Keratinozytenmonolayern führt die Veresterung an C₁₇ und C₂₁ lediglich zu einer moderaten Veränderung verglichen zu der Halogenierung oder Einführung der Doppelbindung in das Steroidgerüst (Hein et al., 1994).

So zeigt Prednicarbat bei atopischer Dermatitis eine gute Wirksamkeit gegenüber der Plazebo-Anwendung bei geringem Nebenwirkungsrisiko (Lawlor et al., 1995). Im Neutralrot-Test an Fibroblasten und Keratinozyten erwies sich Prednicarbat als etwas toxischer als Hydrocortison, aber als nicht so potent wie Betamethasonvalerat (Korting et al., 1995).

In einer vorhergehenden Studie (Gysler, 1998) wurde eine Akkumulation von Prednicarbat im Stratum corneum beobachtet, das demnach sowohl Reservoir- als auch Barrierefunktion hat. Zudem zeigte eine geringe systemische Wirkung des Präparates, dass die Metabolisierung von Prednicarbat nahezu vollständig verläuft (Kellner et al., 1986).

In einer Studie von Hopf und Mathias (1989) wurden bei der Anwendung von Prednicarbat vermehrt Kontaktdermatiden beobachtet. Dafür konnten der Zusatz von Glycerinmono- und dioleat wie auch der Wirkstoff selber verantwortlich gemacht werden. Stefan und Linfert (1995), bemerkten zwischen einer ein- und zweimaligen Gabe der Prednicarbat-Salbe keinen Unterschied in ihrer Studie, so dass sie eine einmalige Gabe täglich als ausreichend bezeichneten. Trotz allem empfiehlt Beutler (1993) Prednicarbat als stark wirksames Cortikosteroid mit Vorsicht einzusetzen.

2.3 Applikation auf der Haut

2.3.1 Dermale Zubereitungen

An dieser Stelle soll ein kurzer Überblick über die Definitionen des Europäischen Arzneibuches, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002, gegeben werden. Neben den allgemeinen Aussagen werden die Untermonographien der Salben und Cremes erläutert, da nur diese in dieser Arbeit untersucht wurden. Zusätzlich zählt das Arzneibuch auch noch Arzneiformen wie Gele, Pasten usw. auf. Das Kapitel halbfeste Zubereitungen zur kutanen Anwendung (kao. 4.00/0132) beschreibt diese Arzneiformen allgemein als homogen und zähelastisch bzw. als nicht-Newtonsche Systeme. Sie sind einzusetzen zur lokalen und transdermalen Wirkstofffreisetzung und können Ein- und Mehrphasensysteme sein.

Salben sind laut Arzneibuch einphasige Systeme, in der feste oder flüssige Substanzen dispergiert sein können. Man unterscheidet hydrophobe Salben, die kleine Mengen Wasser aufnehmen können, wasseraufnehmende Salben, die nach einer größeren Wasseraufnahme je nach Emulgatortyp in O/W- oder W/O-Cremes übergehen können, und hydrophile Salben, deren Grundlagen mit Wasser mischbar sind.

Cremes hingegen sind mehrphasige Zubereitungen aus lipophiler und hydrophiler Phase. Lipophile Cremes sind in der äußeren Phase lipophil, hydrophile Cremes demnach hydrophil.

Dieser Einteilung wird bei der Benennung von dermalen Fertigarzneimitteln aber nur selten gefolgt, eher entscheidet hier bei der Deklaration die Viskosität und Abwaschbarkeit einer Zubereitung.

Die Herstellungsweise hat einen großen Einfluß auf den Zustand des Arzneistoffes. So können durch Erwärmen verschiedene metastabile Zustände des Wirkstoffes durchlaufen werden, was bei einer Lagerung unter niedrigeren Temperaturen zu Instabilitäten führen kann und letztendlich in einer Umwandlung in einen stabileren Zustand resultiert. So wurde die Langzeitstabilität von hydrocortisonhaltigen O/W-Cremes von Niemi (1989a) untersucht und eine Agglomeration von Hydrocortison-Kristallen in der Paraffin/Wasser-Grenzfläche festgestellt. Die Kristalle liegen aufgrund einer Energieminimierung parallel zueinander geordnet vor. Außerdem ist eine Wanderung des Wirkstoffes von der einen in die andere Phase möglich. So wurden O/W/O-Emulsionen beobachtet, in denen Hydrocortison von der inneren öligen durch die mittlere wässrige in die äußere Phase wandert, so dass dieses System nach einem anfänglichen Booster-Effekt zur verlängerten Freigabe von Hydrocortison angewendet werden konnte (Laugel et al., 1998).

2.3.2 Freisetzungen und bisherige Permeationsergebnisse

Neben der Auswahl des Vehikels wird die Freisetzung und Permeation auch durch verschiedene Faktoren, wie Hautstatus, Wirkstoff-Aktivität, Freisetzungsgeschwindigkeit und Stabilität der Salbe beeinflusst. Bei intakter Haut wird das Stratum corneum als geschwindigkeitsbestimmende Barriere angenommen (Refai, 2001). Hier muss ein Vehikel mit einer hohen Wirkstoff-Aktivität verwendet werden. Die Freigabe aus Suspensionssalben beinhaltet zunächst die Liberation von gelöstem Arzneistoff und gleichzeitige Nachlösung des festen Wirkstoffanteils, die Diffusion innerhalb der Salbe und die Effusion, das heißt den Übertritt in die wässrige Akzeptorphase (Horsch et al., 1971). Bei nicht intakter Haut ist die Freisetzungsgeschwindigkeit bestimmend, so dass hier Lösungssalben mit einem niedrigen Diffusionswiderstand eingesetzt werden können (Lippold, 1984). Die Liberation des Arzneistoffes ist daneben abhängig von der Korngröße und der Löslichkeit in dem Vehikel, und damit von der Grundlage und dessen Viskosität (Hüttenrauch und Fricke, 1979; Loth et al., 1984; Smid-Korbar et al., 1982; Refai, 2001). Die Freisetzung aus einer Salbe ist umso

höher, je geringer die Affinität des Wirkstoffes zur Grundlage ist und damit je höher der Verteilungskoeffizient zwischen Stratum corneum und Vehikel liegt. Die Gesamtdosis sollte etwas über der Sättigungskonzentration liegen und die Diffusion in der Salbe schneller sein als in der Stratum corneum-Passage (Malzfeldt et al., 1989).

Bildet der Arzneistoff unterschiedliche Modifikationen aus, dann führt die schneller lösliche Modifikation auch zu einer schnelleren Freisetzung. Das Gleiche gilt für eine Vergrößerung der spezifischen Oberfläche, wobei in Horsch et al. (1975) hervorgehoben wird, dass die Higuchi-Gleichung gerade diese spezifische Oberfläche nicht berücksichtigt. Daneben ist die Freisetzung auch abhängig von der Temperatur (Horsch et al., 1974) und anderen anwesenden Hilfsstoffen. So wird die Hydrocortison-Löslichkeit und damit dessen Freisetzung durch den Einsatz von Emulgatoren erhöht (Niemi et al., 1989b). Der Wasseranteil beeinflusst die Freisetzung auch über eine Änderung der Mikrostruktur der Formulierung. Wird die Formulierung nun auf eine entzündete Hautstelle, die eine erhöhte Temperatur und gute Durchblutung aufweist, aufgetragen, so ist im Vergleich zu einer gesunden Hautstelle eine erhöhte Freisetzung der Formulierung zu erwarten. Allerdings kann bei einer höheren Penetrationsrate des Glucocorticoids die systemische Absorption durch die Vasokonstriktion, als Nebenwirkung des Arzneistoffes, begrenzt werden (Zesch und Schäfer, 1975). Ist der Arzneistoff schlecht wasserlöslich, dann wird ein Transport über die öllöslichen Phasen postuliert. Allerdings gilt auch hier, dass durch die erhöhte Viskosität die Liberation und damit die Permeation verlangsamt wird (Welin-Berger et al., 2001).

Busse (1978) erörtert die Vor- und Nachteile einer Verdünnung cortisonhaltiger topischer Formulierungen. Statt einer Verdünnung wird aber eher die Wahl eines anderen Glucocorticoids empfohlen. Grundsätzlich wird eine möglichst geringe Dosis empfohlen. Dabei scheint es ohne Einfluss zu sein, ob die Dosis in einem Mal oder auf kleinere Portionen verteilt wird, vorausgesetzt, die Formulierung wird nicht abgewaschen. Eine Dosissteigerung erhöht nicht zwangsweise den Therapieerfolg, sondern nur die Wahrscheinlichkeit systemischer Nebenwirkungen (Wester et al., 1977). Eine andere Empfehlung wird von Aalto-Korte und Turpinen (1995) ausgesprochen. Danach sollte eine Hydrocortison-Formulierung am 1. Tag zweimal und an den darauffolgenden Tagen nur jeweils einmal appliziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arzneistoffe

Betamethason, mikronisiert, nach Ph. Eur. 1997 (Synopharm GmbH, D-Barsbüttel)
Hydrocortison, mikronisiert, nach Ph. Eur. 97 (Synopharm GmbH, D-Barsbüttel)
Prednicarbat, Chargennr. H027.01(SS) (Aventis, D-Frankfurt/Main)
Prednisolon, mikronisiert, nach Ph. Eur. NT 2000 (Synopharm GmbH, D-Barsbüttel)
Prednisolon-17-ethylcarbonat, Chargennr. 5694.02(RM) (Aventis, D-Frankfurt/Main)
Prednisolon-21-ethylcarbonat, Chargennr. Gr.1415-1.03(RM) (Aventis, D-Frankfurt/Main)

3.1.2 Hilfsstoffe

Flüssiges Paraffin DAB 10 (Mainland, D-Frankfurt)
Glycerol (Henry Lamotte GmbH, D-Bremen)
Glycerolmonostearat (Caesar & Loretz GmbH, D-Hilden)
Heptadecansäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
Isopropylalkohol (Chemie Vertrieb Hannover, D-Hannover)
Isopropylmyristat (Unichema Chemiegesellschaft mbH, D-Emmerich)
Lanette N, emulgierender Cetylstearylalkohol Typ A (Henkel, D-Düsseldorf)
Octyldodecanol (Caesar&Loretz GmbH, D-Hilden)
Propylenglykol (BASF, D-Ludwigshafen am Rhein)
Vaseline (Hansen & Rosenthal, D-Hamburg)
Wasser in bidestillierter Qualität

3.1.3 Verbrauchsmaterialien und Puffersubstanzen für die HPLC

Acetonitril (Acros Organics, B-Geel)
di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, D-Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, D-Darmstadt)
Methanol (Fluka, D-Neu-Ulm, und J.T. Baker, NL-Deventer)
Wasser in bidestillierter Qualität

3.1.4 Handelspräparate

a) Hydrocortison-Präparate

Folgende Hydrocortison-Präparate, hier aufgeführt mit ihren Inhaltsstoffen gemäß Packungsbeilage, wurden untersucht:

- **Dermallerg-ratiopharm® Creme 1 % / ratioAllerg® Hydrocortisoncreme 2,5 %:** 10 mg bzw. 25mg Hydrocortison / g Creme, Kaliumsorbat E 202 (1mg/g Creme), selbstemulgierende Tri- und Partialglyceride, selbstemulgierende Salbengrundlage O/W, Cetylalkohol, weiße Vaseline, Glycerol, Citronensäure E330, Natriumcitrat E331, Butylhydroxytoluol E321, Palmitoylascorbinsäure, gereinigtes Wasser (ratiopharm GmbH, D-Ulm-Donautal)
- **Hydro Wolff® 0,5/1,0 %:** Hydrocortison, Benzylalkohol, Cetylstearylalkohol, Citronensäure H₂O-frei, Dimeticon 350, Glycerolmonostearat, Natriumcitrat, Dinatriumedetat, Poly(oxyethylen)-20-glycerolmonostearat, Propylenglykol, mittelkettige Triglyceride, weißes Vaseline, Wasser (Dr. August Wolff Arzneimittel GmbH, D-Bielefeld)
- **Hydrocutan Salbe 1,0 % / Hydrocutan Salbe mild:** Hydrocortison (10 mg bzw. 1 mg/1 g Salbe), weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin, Stearylalkohol, Sorbitanesquioleat, Polysorbat 80, Natriumedetat, gereinigtes Wasser (Dermapharm AG, D-Grünwald)
- **Hydroderm HC 0,5 % Creme:** 5mg Hydrocortison / g Creme, dünnflüssiges Paraffin, Cetylstearylalkohol, weißes Vaseline, Cetomacrogol 1000, emulgierendes Wachs, Propylenglykol, Phenoxyethanol, Kaliumsorbat, Sorbinsäure, Natriumedetat, gereinigtes Wasser (Hans Karrer GmbH, D-Königsbrunn)
- **Hydrogalen® Creme:** Hydrocortison (10 mg/1 g Salbe), 2-Phenoxyethanol 3,6 mg, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Propylenglykol, Dimeticon 20, wasserfreie Citronensäure, Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat, gereinigtes Wasser (GALENpharma GmbH, D-Kiel)
- **Hydrogalen® Salbe:** Hydrocortison (10 mg/1 g Salbe), weißes Vaseline, Decyloleat, Dicocoylpentaerythrityldistearylcitrat, Sorbitanesquioleat, gebleichtes Wachs, Aluminiumstearat, mikrokristallines Paraffin, dickflüssiges Paraffin, mittelkettige Triglyceride, dünnflüssiges Paraffin

- **Munitren[®] H fettarm:** Hydrocortison (5 mg/1 g Salbe), Wasser, Stearinsäure, Propylenglykol, Sorbitanmonostearat, Polysorbat, Octyldodecanol, Hartfett (ROBUGEN GmbH, D-Esslingen)
- **Munitren[®] H fettend:** Hydrocortison (5 mg/1 g Salbe), Vaseline, dickflüssiges Paraffin, Wollwachs, Cetylalkohol (ROBUGEN GmbH, D-Esslingen)
- **Remederm HC Creme Widmer:** Hydrocortison (10 mg/1 g Salbe), Dexpanthenol, Retinolpalmitat, α -Tocopherolacetat, 1,3-Distearylhydrogencitrat, Pentaerythrit-dikokosfettsäureester, Glycerolmonooleat, Aluminiumdistearat, Propylenglykol, Sorbitansesquiöleat, gebleichtes Wachs, Hartparaffin, weißes Vaseline, dünnflüssiges Paraffin, Polyethylenwachs, Glycerolmonostearat, Isopropylmyristat, Ölsäuredecylester, Dibutyladipat, 1,3 Butandiol, Sorbitol-Lsg. 70 %, Milchsäure, Butylhydroxytoluol, Butylhydroxyanisol, Edetinsäure, 2-Phenoxyethanol, Imidazolidinharnstoff, gereinigtes Wasser (Louis Widmer GmbH, D-Rheinfelden)
- **Sanatison[®] Mono 1 %, 1/3 % Salbe:** Hydrocortison (3,3 bzw. 10 mg/1 g Salbe), 1 mg Sorbinsäure, 1 mg DL- α -Tocopherol, Glycerol 85 %, Glycerol (-mono, -di)-isostearat, Hexyllaurat, Magnesiumsulfat*7H₂O, Paraffin, THG-Glycerinfettsäureester, THG-Wachs, weißes Vaseline, Vitaminöl (Taurus Pharma GmbH, D-Frankfurt)

b) Prednicarbat-Präparate

Prednicarbat ist derzeit als Dermatop[®] Creme, Salbe und Fettsalbe (Aventis, D-Frankfurt am Main) auf dem Markt erhältlich. In diesen Produkten ist Prednicarbat in einer Konzentration von 2,5 mg/g Formulierung enthalten. Zusätzlich werden die jeweiligen Formulierungen wirkstofffrei angeboten. Folgende Bestandteile sind deklariert:

- **Creme:** Benzylalkohol, Edetinsäure, Fettalkohole (1-Octadecanol = Stearylalkohol, 1-Hexadecanol = Cetylalkohol, 1-Tetradecanol = Myristylalkohol), 2-Octyldodecanol, dünnflüssiges Paraffin, Polysorbat 60, Sorbitanstearat, gereinigtes Wasser
- **Fettsalbe:** Glycerolmonooleat, 2-Octyldodecanol, weißes Vaseline
- **Salbe:** Edetinsäure, Glycerolmonooleat, Magnesiumsulfat, 2-Octyldodecanol, weißes Vaseline, gereinigtes Wasser

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung der Formulierungen

3.2.1.1 Herstellung der Formulierungen

a) hydrocortisonhaltige Formulierungen

	Wasserhaltige hydrophile Salbe	Wasserhaltige hydrophile Salbe 10 % Isopropylalkohol	Wasserhaltige hydrophile Salbe 5 % Isopropylmyristat	Wasserhaltige hydrophile Salbe 10 % Isopropylalkohol 5 % Isopropylmyristat
Hydrophile Salbe	30	30	30	30
Wasser	70	60	65	55
Isopropyl- alkohol	/	10	/	10
Isopropyl- myristat	/	/	5	5

Tabelle 3.1: Rezepturen der Versuchsreihe mit Isopropylalkohol und Isopropylmyristat in % (m/m)

Wasserhaltige hydrophile Salbe wurde gemäß DAB 2003 hergestellt. Die Zusammensetzung der untersuchten Formulierungen ist in Tabelle 3.1 wiedergegeben. Da der Wassergehalt der wasserhaltigen hydrophilen Salbe keinen Effekt auf die Permeation hat (Refai, 2001) wurde sein Anteil zugunsten der Hilfsstoffe Isopropylmyristat und/oder Isopropylalkohol reduziert. Demzufolge unterscheiden sich die Formulierungen geringfügig hinsichtlich ihres Wassergehaltes und ihres lipophilen Anteiles voneinander.

Alle Formulierungen wurden mithilfe des Unguators[®] (GAKO Konietzko GmbH, D-Bamberg) hergestellt (Zobel et al., 1997). Die lipophile und die hydrophile Phase wurden dazu separat auf 50 °C erwärmt und zusammen mit Hydrocortison und den jeweiligen Zusätzen in einer Unguator-Kruke vereint. Die Kruke wurde daraufhin 20 s gerührt und für 10 min im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Diese Abfolge nach Alberg (1998) wurde 3 Mal wiederholt, um eine gleichzeitige Homogenisierung und Abkühlung der Formulierung zu erreichen.

Alle Formulierungen hatten eine Hydrocortison Konzentration von 1 % (w/w) und waren vom Suspensionstyp. Sie wurden bei Raumtemperatur gelagert und am Tag vor dem jeweiligen Versuch angesetzt.

b) prednicarbothaltige Formulierungen

Bei Mischungen der einzelnen Dermatop[®] Formulierungen untereinander bzw. mit ihren Basisformulierungen wurde immer ein Verhältnis 1/1 (m/m) eingewogen und für 30s mit dem Unguator[®] verrührt. Auf eine Mischung zwischen Creme und Fettsalbe wurde verzichtet, da sich diese Grundlagen nicht miteinander mischen lassen.

Bei Zusatz der Enhancer-Kombination wurden Isopropylmyristat und Isopropylalkohol direkt mit der Formulierung in der Unguator[®]-Kruke verrührt. Durch die Verdünnung oder den Zusatz an Hilfsstoffen zu den Original-Formulierungen reduzierte sich der tatsächliche Gehalt an Prednicarbat, was für die spätere Berechnung von Permeationskoeffizienten berücksichtigt wurde.

Die Rezepturzusammenstellungen aus Kapitel 4.3.1 wurden hergestellt, indem Vaseline mit Glycerolmonostearat und Octyldodecanol in der Wärme manuell homogenisiert und beim Erkalten mit dem Wasseranteil versetzt wurde. Prednicarbat wurde in die kaltgerührte Rezeptur B mit dem Unguator[®] eingerührt.

Alle Formulierungen wurden am Tag vor dem jeweiligen Versuch angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.1.2 Dichte der Formulierungen

Die Dichten der halbfesten Formulierungen wurden mit einem Beckman Luft Vergleichspyknometer 930 (Beckman, D-München) bestimmt, wobei jeweils etwa 4-5 g der Formulierung vermessen wurden. Die Dichte der Formulierungen wurde zur Berechnung des Permeationskoeffizienten benötigt und direkt nach dem Permeationsexperiment mit der restlichen Formulierung gemessen.

3.2.1.3 Bestimmung der Sättigungskonzentration

a) Im Medium

Um die Sättigungskonzentration eines Arzneistoffs in einer bestimmten Flüssigkeit zu bestimmen, wurde eine gesättigte Lösung hergestellt, bei 20 °C gelagert und der Arzneistoffgehalt im Überstand mittels HPLC gemessen.

b) In der Formulierung

Die Sättigungskonzentration in einer Formulierung lässt sich zuverlässig nur mikroskopisch ermitteln. Hierzu wurden verschieden konzentrierte Formulierungen hergestellt und mit einem Zeiss Photomikroskop III (Zeiss, D-Oberkochen) auf Arzneistoffkristalle hin untersucht. Die Formulierungen wurden für die Untersuchungen mindestens 24 h bei 20 °C gelagert. Die geringste Arzneistoffkonzentration mit nachweisbaren Kristallen in der Formulierung wurde als Sättigungskonzentration deklariert (Loth et al., 1979).

3.2.1.4 Polarisationsmikroskopie

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Photomikroskop III (Zeiss, D-Oberkochen) durchgeführt. Zur Darstellung wurde eine Digitalkamera Olympus DP 12 (Olympus Deutschland GmbH, D-Hamburg) und die dazugehörige Software Olympus DP 12 Version 3.2 (Soft Imaging System GmbH, D-Münster) verwendet.

3.2.1.5 Phasenlage der Formulierung

Die Phasenlage der Formulierung wurde durch Anfärben mit Sudanrot (Merck, D-Darmstadt) und Methylenblau (Merck, D-Darmstadt) ermittelt. Zusätzlich wurde die elektrische Leitfähigkeit mit einem Leitfähigkeitsmessgerät (Christ AG, CH-Basel) überprüft.

3.2.1.6 Säulenchromatographie

Zur Säulenchromatographie wurde eine Säule (250 mm x 22 mm) mit Kieselgur (Merck, D-Darmstadt) suspendiert in dem jeweiligen Fließmittel gefüllt. Als Fließmittel wurden 200 ml

einer Mischung Ether/Hexan (70/30) (Glycerolmonostearat) bzw. Ethylacetat/Toluol (5/95) (Octyldodecanol) verwendet, wovon mit etwa 5 ml 0,5 g Formulierung gelöst und auf die Säule gegeben wurde. Ein Fraktionswechsel fand alle 5 min statt.

3.2.1.7 Dünnschichtchromatographie

Die einzelnen Fraktionen der Säulenchromatographie wurden zur Identifizierung der enthaltenen Substanzen per Dünnschichtchromatographie untersucht. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Monographien für Glycerolmonostearat und Octyldodecanol nach Ph. Eur. 4. Ausgabe, Grundwerk 2002.

Alle Fraktionen, sowie die Standardsubstanzen, wurden auf eine DC-Alufolie Kieselgel 60 F254 (Merck, D-Darmstadt) aufgetupft. Zur Detektion von Glycerolmonostearat wurde eine RhodaminB/Ethanol-Lösung verwendet und bei UV-Licht der Wellenlänge 365 nm ausgewertet. Die Detektion von Octyldodecanol wurde mit Vanillin/Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen auf 120 °C für 5 min durchgeführt.

3.2.1.8 Gaschromatographie

Die Fraktionen 16-23 der Säulenchromatographie für Glycerolmonostearat wurden mit einem Rotavaopor (Büchi, CH-Flawil) bei 40 °C, an dem eine Membranpumpe ABM (Wacobrand GmbH+Co., D-Wertheim) angeschlossen war, einrotiert. Die Analyse der Fettsäuren der Monoglycerole erfolgte nach Umesterung als Methylester nach einer Standardprozedur mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH, Fluka, D-Seelze). Dazu wurden 100 µl tert.-Butylmethylether-Lösungen der Monoglycerole mit 25 µl 0.2 M TMSH vermischt und nach 10 min bei RT direkt untersucht. Die Retentionszeit lag bei 20,45 min.

Zur Bestimmung von Octyldodecanol wurden die Fraktionen 16-23 der Säulenchromatographie einrotiert und der gleichen Gaschromatographie-Analyse unterworfen, wobei eine vorherige Umesterung nicht nötig war. Die Retentionszeit lag bei 16,28 min.

Die Anlage bestand aus einem Hewlett Packard 5890A Gaschromatographen, bestückt mit einer 3 m x 0,32 mm Vorsäule (fused silica, deaktiviert,) und einer 30 m analytischen Trennsäule ZB1 (30 m x 0,32 mm ID, $d_f=0,25\text{ }\mu\text{m}$, beides Phenomenex, D-Aschaffenburg). Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 1,6 ml/min. Der Injektor wurde auf 280 °C vortemperiert und hatte ein Injektionsvolumen von 1 µl. Es wurde folgendes

Temperaturprogramm gefahren: für 3 min wurden 100 °C gehalten und dann in Temperaturschritten von 10 °C/min auf 330 °C aufgeheizt, die dann anschließend 5 min gehalten wurden. Die Kapillarsäule war direkt mit einem Triple Quadrupole Massenspektrometer verbunden (Finnigan TSQ 700, US-Waltham), wobei die Transferline auf 280 °C temperiert wurde. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 180 °C und die Ionisierungsenergie 70 eV.

3.2.1.9 Thermogravimetrie

Zur Bestimmung des Wassergehaltes der Formulierung wurde eine Thermogravimetrie vorgenommen. Es wurden etwa 10 mg Formulierung in einen offenen Aluminiumtiegel SSC000E030 (Seiko, J-Tokyo) eingewogen und mit einer TG/DTA 220 mit Diskstation 5200H (Seiko, J-Tokyo) vermessen. Das Gerät war zuvor mit Indium und Zinn kalibriert worden.

3.2.2 Permeationsuntersuchungen und deren Vorbereitungen

3.2.2.1 Isolierung von Stratum Corneum

Zur Präparation von humanem Stratum corneum wurde ausschließlich aus der plastischen Chirurgie stammendes gesundes Abdominal- und Brustgewebe weiblicher Patienten verwendet. Zunächst wurde das Gewebe grob von Fett und Bindegewebe getrennt und nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei – 25 °C im Gefrierschrank gelagert.

Humanes Stratum corneum wurde nach der Methode von Kligman und Christophers (1963) isoliert. Hierzu wurde die Haut weitgehend von Fett und Bindegewebe befreit und für 24 h bei 37 °C mit der Dermis-Seite in eine 0,1 % Trypsin-Lösung eingelegt. Danach wurde das Stratum corneum von oben abgenommen und nach Spülen in 0,01 % Trypsin-Inhibitorlösung (Sigma Chemical Co., D-Dreisenhofen) in Wasser gewaschen und auf einem Teflonsieb über Blaugel getrocknet. Da die Lipide während der Lagerung eine Veränderung erfahren könnten, wurde das Stratum corneum innerhalb von 4 Monaten verbraucht.

Für Permeationsversuche wurde getrocknetes SC verwendet. Um aber Strukturaufklärungen vorzunehmen, wurde hydriertes Stratum corneum benötigt. Hierzu wurde es für mindestens 48 h in einem Exsiccator über gesättigter Natriumchlorid-Lösung gelagert, so dass in dieser

definierten Luftfeuchte von 75,2 % ein Wasser-Gehalt von etwa 20 % im Stratum corneum erreicht werden konnte.

3.2.2.2 Artificial Skin Construct-Herstellung

Die Züchtung der organotypischen Hautkonstrukte (ASC; Artificial Skin Constructs) erfolgte nach einer Methode von Specht (1999) mit einer Modifizierung nach Wassermann und Müller-Goymann (2000) im institutseigenem Labor. Hierzu wurden humane Fibroblasten, die aus Neugeborenenenvorhaut stammten, zur Ausbildung eines Dermisäquivalents verwendet (Dr. Kriwet, Organogenesis, US-Camden). Als Epidermisäquivalent diente eine spontan transformierte menschliche HaCaT-Zelllinie (Human adult keratinocytes, low Calcium conditions, elevated Temperature) (Prof. Dr. N.E. Fusenig DKFZ, D-Heidelberg).

Die Kultivierung beider Zellarten erfolgte unter Standardbedingungen in Ready Mix (DMEM High Glucose PAA, A-Linz). Zunächst wurde ein Dermisäquivalent direkt in Transwell Membraneinsätzen, die in die Vertiefungen von Sixwell-Zellkulturplatten gehängt wurden (beides Costar, D-Fernwald), hergestellt. Hierbei wurden die Fibroblasten in ein Kollagengel aus Kollagen Typ I eingebettet. So wurden für 6 ASC 5,6 ml Gelvormischung bestehend aus 2,2 ml MEM (ICN, D-Eschwege), 0,2 ml L-Glutamin (Gibco, D-München), 0,7 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (71,2 mg/ml) und 2,5 ml fetalem Kälberserum eingesetzt. Dieser Gelvormischung wurden 19 ml einer essigsauren Kollagenlösung (2,4 mg/ml steriler Essigsäure 0,05 %) zugesetzt. Darauf wurden anschließend schnell 2 ml Zellsuspension (eingestellt auf etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen) in pH-neutraler Mischung verteilt, bevor sich das Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten bildete. Innerhalb von 7 Tagen kontrahierte das Kollagengel und darauf wurden $2-2,5 \cdot 10^5$ Keratinozyten (Passage 68-76 mit $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) auf jedes Gel aufgesät und weitere 7 Tage submers kultiviert. Daraufhin wurde der Mediumspegel abgesenkt und die Zellen für weitere 14 Tage kultiviert. So wurden die Zellen nur von unten mit einer Mischung versorgt, bestehend aus 3 Teilen DMEM (ohne Glucose) und 1 Anteil Ham's F12 (beide Gibco, D-München), das mit Adenin (24,3 µg/ml), Insulin (5 µg/ml), Dexamethason (0,4 g/ml), Triiodthyronin (20 ppm, alle Sigma, D-Deisenhofen), Transferrin (5 µg/ml, ICN, D-Eschwege), Ethanolamin (6,1 µg/ml), Phosphorylethanolamin (14,1 µg/ml, beide Biochrom, D-Berlin), seleniger Säure (6,8 ng/ml, Aldrich, D-Steinheim), Gentamycin (Biochrom, D-Berlin) und fötalem Kälberserum (2 %, Gibco, D-München) angereichert war.

3.2.2.3 Puffer für die Permeation und pH-Bestimmung

Der Puffer wurde in Anlehnung an die natriumchloridhaltige Phosphat-Pufferlösung pH 7,4 R (Ph. Eur. 4. Ausgabe, Grundwerk 2002) hergestellt, wobei der Anteil an Natriumchlorid, das in der HPLC Störungen verursachen kann, ersetzt wurde. Es wurden 2,38 g Natriummonohydrogenphosphat und 0,19 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1 l Wasser gelöst und mit Kaliumdihydrogenphosphat auf pH 7,4 eingestellt. Als pH-Meter wurde ein PH 539 (Wissenschaftliche Technische Werkstätten, D-Weilheim) verwendet. Die Kalibrierung wurde mit Standardpufferlösungen von pH 4,66 und pH 9,00 (Merck, D-Darmstadt) durchgeführt.

3.2.2.4 Permeationsuntersuchungen

Für die Permeation wurde eine modifizierte Franz-Zelle (Abb. 3.1) verwendet. In den Donator wurde die jeweilige Formulierung eingefüllt, der Akzeptor wurde mit einem Phosphat-Puffer pH 7,4 (3.2.2.3) (0,018 mol/l) befüllt. Zwischen Donator und Akzeptor wurde entweder Stratum corneum oder ASC gespannt. Das Stratum corneum wurde dazu auf einen Polycarbonatfilter TMTP 0,5 µm (Millipore, D-Eschborn) gezogen, um eine höhere Stabilität zu erreichen. Da das Hautkonstrukt im Transwell auf einem Polycarbonatfilter gewachsen war, wurde es mitsamt diesem Filter auf den Akzeptor gelegt. Während des Versuches wurde die Akzeptorlösung fortwährend mit einem Magnetkern gerührt. Die Franz-Zelle wurde insgesamt in ein Wasserbad von 37 °C gestellt, so dass am Stratum corneum oder ASC eine Temperatur von 32 °C herrschte. Permeationsexperimente wurden über 32 h durchgeführt, wobei alle 2 h 250 µl Akzeptor-Lösung entnommen und durch vortemperierten Puffer ersetzt wurden.

Für eine Serie von Permeationsexperimenten wurde nur Stratum corneum eines Spenders verwendet, da interspezifische Variabilitäten nicht ausgeschlossen werden können (Southwell et al., 1984).

In der vorliegenden Arbeit werden die Permeationsdaten als Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Hierbei werden die akkumulierten Arzneistoffkonzentrationen in der Akzeptorphase bezogen auf die Permeationsfläche des Stratum corneum zugrunde gelegt. Speziell für die Permeationen aus Dermatop®-Formulierungen wurden aus den Daten der Metabolite über deren Molgewichte die entsprechenden Prednicarbat-Konzentrationen errechnet und in Form eines Summenwertes in

der Permeationskurve wiedergegeben. Damit konnte unabhängig von der Metabolisierungsrate der Einfluss der Formulierung auf die Prednicarbat-Permeation betrachtet werden.

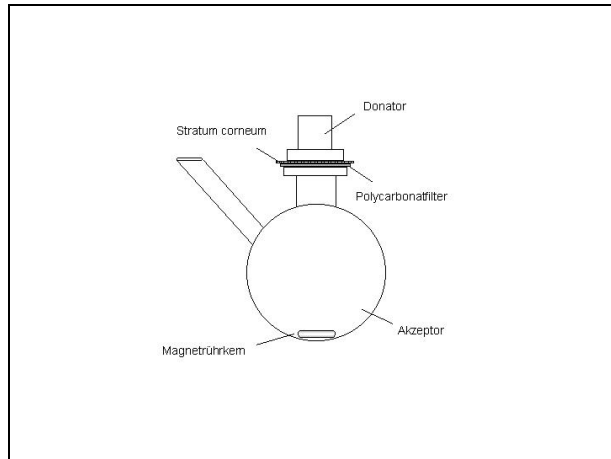


Abbildung 3.1: Aufbau der modifizierten Franz-Zelle

3.2.2.5 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

a) Hydrocortison

Die HPLC-Analyse für Hydrocortison wurde mit einer Reversed phased Säule (250x4 mm) gefüllt mit Hypersil ODS 5 μm (Grom, D-Herrnberg) durchgeführt. Als mobile Phase wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch (6:4) mit einer Flussrate von 1,1 ml/min verwendet. Hydrocortison konnte dann bei einer Retentionszeit von 4,8 min und mit einer Wellenlänge von 250 nm detektiert werden. Die Anlage bestand aus einer Membranpumpe Beckman System Gold Solvent Delivery System 126 (Beckman, D-München) und einem UV-Detector Gold Detector Module 166 (Beckman, D-München). Die Probenaufgabe der Permeationsexperimentes aus Kapitel 4.1 erfolgte durch einen Marathon Autosampler (Knauer, D-Berlin-Zehlendorf). Die Peak-Identifizierung und -Analyse wurde mit der Beckman Gold Chromatography Software Version 6.01 (Beckman, D-München) durchgeführt.

Lineare Korrelation zwischen Peakfläche und Hydrocortisonkonzentration wurde zwischen 1 ng/ml - 100 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Der Korrelationskoeffizient betrug $> 0,999$.

b) Prednicarbat

Die Proben wurden sofort mit 0,1 ml Natriumfluorid-Suspension (120 mg/ml) versetzt, um eine eventuelle Metabolisierung zu stoppen. Desweiteren wurde 250 µl Betamethason-Lösung (5 µg/ml) als interner Standard zugesetzt. Die wässrige Lösung wurde zwei Mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt und mit einer Laborzentrifuge Allegra 64R (Beckman, D-München) bei 4 °C mit 200-facher Erdbeschleunigung für 5 min zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden bei Raumtemperatur vereinigt und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 250 µl Methanol aufgenommen und mit Hilfe der HPLC analysiert. Die Methode wurde in Anlehnung an Gysler (1998) erarbeitet. Dabei wurde eine Niederdruck-Gradientenelution durchgeführt. Als mobile Phase wurde Wasser und Acetonitril im Verhältnis 80 zu 20 über einen Zeitraum von 20 min linear zu einem Verhältnis von 20/80 umgekehrt. Die Flussrate wurde dabei konstant auf 1 ml/min gehalten und die Detektion erfolgte bei 254 nm. Die Auswertung und Analyse erfolgte mit der Karat-Software (Beckman, D-München). Die Retentionszeiten lagen für Prednisolon bei 8,3 min, für Betamethason bei 10,0 min, für Prednisolon-17-ethylcarbonat bei 12,2 min, für Prednisolon-21-ethylcarbonat bei 13,8 min und für Prednicarbat bei 17,2 min.

Eine lineare Korrelation wurde für jede Substanz zwischen 0,5-5 µg/ml erreicht. Der Korrelationskoeffizient betrug $> 0,999$.

3.2.3 Stratum Corneum Charakterisierung

3.2.3.1 Arzneistoffsättigung im Stratum corneum

a) Hydrocortison

Nach einem Permeationsexperiment wurde das Stratum corneum vorsichtig vom Donor- und Akzeptor-Kompartiment getrennt. Es wurde mit Filterpapier von eventuellen Resten der Formulierung gesäubert und für 24 h in 0,25 ml Ethanol eingelegt. Danach wurde das Stratum corneum mit weiteren 0,25 ml Ethanol gewaschen. Die Ethanol-Phasen wurden vereinigt und nach vollständiger Evaporation des Ethanols der Rückstand in 0,25 ml Wasser aufgenommen und abschließend in der HPLC vermessen.

b) Prednicarbat

Da die Permeation von Stratum corneum mehrere Tage benötigte, um nachweisbare Mengen an Prednicarbat im Akzeptor-Kompartiment zu erhalten, wurden zur Ermittlung der Sättigungskonzentration von Prednicarbat in humanem Stratum corneum abgemessene und abgewogene Stücke Stratum corneum in die jeweilige Formulierung gelegt und verschlossen für 24 Stunden bei 37 °C im Trockenschrank verwahrt. Danach wurden die Stücke vorsichtig mit Filterpapier abgetupft, um Salbenreste abzutrennen. Die so erhaltenen Stücke Stratum corneum wurden in 500 µl Ethylacetat für 24 h eingelegt, um das Prednicarbat und dessen Metaboliten herauszulösen. Die Stücke wurden aus der Lösung entfernt und dann noch einmal mit 500 µl Ethylacetat abgespült. Die Lösung selber wurde zur Trockne eingedampft und nach Aufnahme des Rückstandes mit 250 µl Methanol in der HPLC vermessen.

3.2.3.2 Metabolisierung

Zur Beobachtung der metabolischen Aktivität von excidiertem humanem Stratum corneum im Vergleich zu den Hautkonstrukten wurden die jeweiligen Gewebe in ReadyMix (komplettiertes DMEM-Kulturmedium, PAA, A-Linz), das mit 7,4 µg/ml Prednicarbat angereichert worden war, versetzt. Dabei wurden die Hautkonstrukte in dem Transwell belassen und das Medium, wie in der Kultivierung, von unten angeboten. Die Stratum corneum-Proben wurden hinsichtlich Länge, Breite und Höhe vermessen und vollständig in Medium eingelegt. Während der Dauer des Experimentes lagerten die Hautkonstrukte im Inkubator und die Probengefäße mit dem Stratum corneum im temperierten Wasserbad bei 38 °C. Es wurden alle 2 h 250 µl Proben entnommen und über die HPLC vermessen. Entnommenes Probenvolumen wurde bei den Hautkonstrukten mit Prednicarbat-haltigem Medium ergänzt, damit die Konstrukte nicht durch einen abgesunkenen Flüssigkeitsspiegel austrocknen konnten.

Zeitgleich wurde als Blindlösung ReadyMix-Kulturmedium, das 7,4 µl Prednicarbat/ml enthielt, im Inkubator und Wasserbad gehalten und auch hier Proben gezogen. Dieses Medium enthielt einen definierten Anteil an Kälberserum und darin enthaltene Enzyme, die ebenfalls Prednicarbat abbauen konnten. Demzufolge war der tatsächliche Prednicarbat-Gehalt, der dem Hautkonstrukt und dem Stratum corneum zum Abbau zur Verfügung stand, geringer als die ursprünglich eingesetzte Menge. In den Abbildungen 4.18 und 4.19 wird diesem Umstand Rechnung getragen, indem auf der Ordinate der Gehalt des jeweiligen

Derivates, gemessen an seinem Maximalgehalt in der Blindlösung, aufgetragen worden ist. Aufgrund der unterschiedlichen Volumina von Hautkonstrukt und excidiertem humanen Stratum corneum ist dieser Gehalt auf das Volumen des Gewebes (als Quader beim Stratum corneum und als Säule bei dem Hautkonstrukt) bezogen worden.

3.2.3.3 Neutralrot- und MTT-Test

Beide Tests dienten als Vitalitätsbeweis der Hautkonstrukte nach Einwirkung von dem Medium ReadyMix (komplettiertes DMEM-Kulturmedium, PAA, A-Linz), das mit 8,80 µg/ml Prednicarbat versetzt worden war. In beiden Fällen wurden je 3 Hautkonstrukte mit je 3 ml dieses Mediums unterschichtet und 32 h im Brutschrank (Integra-Bioscience, D-Fernwald) inkubiert. Für den MTT-Test in der nach Wassermann und Müller-Goymann (2001) modifizierten Form wurde anschließend jedem Hautkonstrukt 100 µl 0,5 %-MTT-Lösung (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyl-Tetrazoliumbromid, Sigma, D-Deisenhofen) über das MSBM 2 %-Medium (minimalsupplementiertes Basalmedium mit 2 % fetalem Kälberserum ohne Glucosezusatz) zugeführt und für weitere 2 h inkubiert. Danach wurde mit einem Biopsiestanzer (Durchmesser 10 mm) aus der Mitte eine Probe entnommen. Der blaue Farbstoff wurde nun unter Lichtausschluss über 30 min aus dem Hautkonstrukt in 100 µl SDS und 1 ml Aufschlussreagenz (Isopropanol 100 % mit 0,4 ml 10 N Salzsäure) extrahiert (IKA-Vibrax-VXR, Janke&Kunkel, D-Staufen i.Br.). Das blau gefärbte Extraktionsmittel wurde anschließend bei 570 nm photometrisch (UV 210A, Shimadzu, Duisburg) vermessen.

Für den Neutralrot-Test wurden die Konstrukte, die in dem mit Prednicarbat versetzten Medium gelegen haben, vom Medium befreit, mit 0,5 ml Phosphatpuffer PBS (ICN, D-Eschwege) einmalig gewaschen und mit 3 ml Neutralrotlösung (151,1 µg/10 ml Medium) (Sigma, D-Deisenhofen) versetzt. Nach 3 h Brüten wurde die Farbstofflösung abgesaugt und das Hautkonstrukt drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Aus dem Konstrukt wurde mittels eines Biopsiestanzers jeweils eine Probe von 10 mm Durchmesser ausgestanzt. Nach Zugabe von 1,2 ml Ethanol-Essigsäure-Lösung (50 % Ethanol mit 1 % Essigsäure) und 25 min Schütteln, sowie Auf- und Abpipettieren, wurde der Farbstoff aus den Zellen extrahiert und konnte bei 540 nm photometrisch vermessen werden. Die Kontrollwerte, die von Konstrukten in reinem Medium erhalten wurden, konnten als 100 % lebend angenommen werden (Winkler und Müller-Goymann, 2002a).

3.2.3.4 Dynamische Differenzkalorimetrie

Um den Einfluß der Formulierungen auf die Lipidmatrix des Stratum corneum zu untersuchen, wurde ein Differential Scanning Calorimeter DSC 220C mit einer Diskstation SSC 5200H (Seiko, J-Tokyo) verwendet. Hierbei wurde eine Probe einer Temperaturerhöhung von -20°C auf $+140^{\circ}\text{C}$ mit einer Heizrate von $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ unterworfen und simultan die jeweiligen Enthalpien gemessen.

Grundsätzlich wird bei einer Erhöhung des Wassergehaltes im Stratum corneum eine Verschärfung der Peaks beobachtet (Knutson et al., 1985). Aus dem Grunde wurden hydratisierte Stratum corneum-Proben vermessen. Zur Probenvorbereitung wurde etwa 12 mg Stratum corneum (3.2.2.1) in die jeweilige Formulierung gelegt und für 30 min bei 37°C gelagert. Danach wurde das Stratum corneum vorsichtig mit Filterpapier von der Formulierung befreit und in einen Aluminiumtiegel SSC000C008 (C3 Analysis Technique, D-Baldheim) gefaltet. Der Tiegel wurde daraufhin kalt verschweißt.

Ein leerer Tiegel diente bei der Messung als Vergleich. Zudem wurden jeweils 3-5 mg der reinen Formulierungen vermessen, um störende Temperaturübergänge in den betrachteten Temperaturbereichen auszuschließen. Das Gerät war zuvor mit Indium und Zinn kalibriert worden.

3.2.3.5 Röntgenweitwinkelbeugung nach Debeye-Scherrer

Hydriertes Stratum corneum wurde für 30 min bei 37°C in die Formulierung eingelegt und danach vorsichtig mit Filterpapier gesäubert. Als Probenträger diente eine Glaskapillare ($d = 0.5\text{ mm}$)(Glas, D-Berlin), in die das vorbehandelte Stratum corneum eingebracht wurde. Die Probe wurde für 24 h in eine Debeye-Scherrer Camera (Umfang 360 mm), die auf einem Röntgengenerator PW 1830 (Philips, D-Kassel) mit einer Röntgenröhre PW 2253/11 (Philips, D-Kassel) montiert war, eingebracht. Die Beschleunigungsspannung betrug 40 kV, wobei ein Anodenstrom von 40 mA resultierte. Die Wellenlänge der Strahlung lag bei 0,154 nm. Die Interferenzringe wurden auf einem X-ray Structurix D 7 FW Film Material (Agfa, D-Köln) aufgenommen und nach genauer Ausmessung des Durchmessers über die Bragg'sche Gleichung verrechnet. Eine Aufweitung der Interferenz von 0,005 nm bedeutet dabei eine Verschiebung des Interferenzringes um 1,06 mm.

In Kapitel 4.1.3.2 a) sind exemplarisch die jeweiligen Breiten der Interferenzringe aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Interferenzringe miteinander verglichen und ausgewertet, die sich vollständig in ihrer Lage unterscheiden lassen.

Aufgrund der Knappheit an Stratum corneum-Material konnten diese Messungen nicht wiederholt werden. Daher wurden Einzelwerte analysiert. Mit dem Datenvergleich innerhalb dieser Arbeit, aber auch vorhergehender Arbeiten dieser und anderer Arbeitsgruppen, lässt sich eine weitgehende Übereinstimmung in der Lage der Interferenzen beobachten. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass nach Behandlung der Stratum corneum-Proben verschiedener Probanden aufgrund der individuellen Lipidzusammensetzungen die Verschiebung der Interferenzen unterschiedlich stark ausfällt.

3.2.3.6 Röntgenkleinwinkelbeugung nach Kiessig

Hydratisiertes und in die jeweilige Formulierung eingelegtes Stratum corneum wurde für 30 min bei 37 °C gelagert und danach vorsichtig mit Filterpapier von der Formulierung befreit. Die Probe wurde in einen würfelförmigen Probenhalter zwischen zwei röntgenamorphen Kapton-Folien (Krempel, D-Vaihingen) gefaltet. Diese Probe wurde so für 400 s in einer Kiessigkamera (Probenträger und Kamera, Institutseigenbau) mit den unter 3.2.3.5 beschriebenen Messparametern vermessen.

Nach Berechnung der Daten mithilfe der Bragg'schen Gleichung wurden die erhaltenen Diffraktogramme zusätzlich noch über eine Fast Fourier Transformation mit 2ppt geglättet.

Die Messungen konnten wegen des großen Probenverbrauchs nur als Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Da die Stärke der Interferenzen von der jeweiligen Menge an Lipidmatrix abhängt und hier lediglich qualitative Aussagen bezüglich der Interferenzlagen gefordert waren, wurde die aussagekräftigste Messung zur Interpretation herangezogen.

3.2.3.7 Statistische Auswertung

Zur Überprüfung, ob verschiedene Mittelwerte der gleichen Grundgesamtheit angehören, wurde ein zweiseitiger Student-t-Test durchgeführt. Hierbei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 zugrunde gelegt.

4 Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1 Hydrocortison-Präparate

Alberg (1998) untersuchte das Fertigarzneimittel Soventol[®] HC Creme (Dr. Rentschler Arzneimittel GmbH & Co., D-Laupheim) hinsichtlich des Permeationsverhaltens von Hydrocortisonacetat. Obwohl der Hydrocortisonacetat-Gehalt nur 0,25 % beträgt, wies dieses Fertigarzneimittel im Vergleich mit der wasserhaltigen hydrophilen Salbe (versetzt mit 2 % Hydrocortisonacetat) einen 4,8fach höheren Flux auf. Refai (2001) konnte die Überlegenheit der Formulierung mit dem Arzneistoff Hydrocortison bestätigen. Darüber hinaus wurde den in der Soventol[®]-Grundlage enthaltenen Hilfsstoffen Isopropylmyristat und Isopropylalkohol ein Einfluss auf die Stratum corneum-Struktur zugesprochen. Konkrete Erklärungen bezüglich der Wirkmechanismen dieser Hilfsstoffe und auch des Zusammenspiels der Sättigungskonzentrationen in Vehikel und Haut sind mit den Ergebnissen der zitierten Dissertationen aber nicht möglich. Im folgenden Kapitel werden die Einflüsse von Isopropylmyristat und Isopropylalkohol sowie deren Kombination auf excidiertes humanes Stratum corneum beschrieben und hinsichtlich möglicher Mechanismen ausgewertet.

4.1.1 Einfluss von Isopropylmyristat, Isopropylalkohol und deren Kombination in wasserhaltiger hydrophiler Salbe auf excidiertes humanes Stratum corneum

4.1.1.1 Permeationen von Hydrocortison aus wasserhaltiger hydrophiler Salbe versetzt mit Isopropylmyristat und Isopropylalkohol

Die Permeation eines Arzneistoffes ist abhängig von dem Verteilungskoeffizienten zwischen Vehikel und Stratum corneum bzw. dem Stratum corneum und der Akzeptor-Phase. Strukturelle Veränderungen des Stratum corneum, hervorgerufen durch die Hilfsstoffe der Formulierung, kommen in den Verteilungsgleichgewichten zum Ausdruck. Über den Vergleich zwischen den Permeationen aus Formulierungen mit und ohne Zusatz lässt sich bereits das Ausmaß dieser Veränderungen erkennen.

Die Permeationskurve von Hydrocortison aus der Formulierung mit Isopropylmyristat (Abb. 4.1) liegt, verglichen mit der ohne Isopropylmyristat, wesentlich niedriger, wobei die Mengen an permeiertem Hydrocortison mit den von Refai (2001) untersuchten Permeationen von Hydrocortison aus wasserhaltiger hydrophiler Salbe vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu

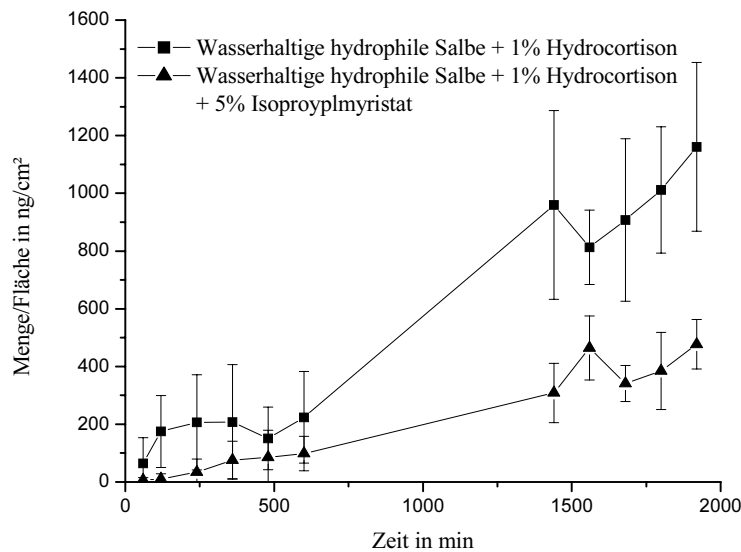


Abbildung 4.1: Permeation von Hydrocortison durch excidiertes humanes Stratum corneum (n=5-8) (Spender: weibl., 46 J., Brust)

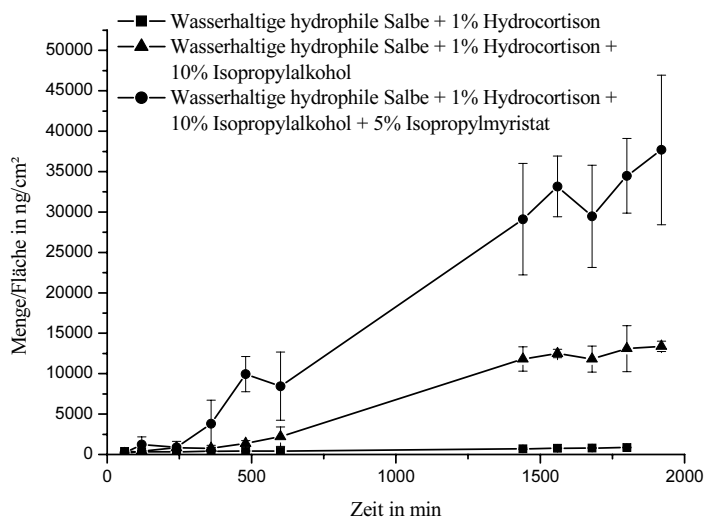


Abbildung 4.2: Permeation von Hydrocortison durch excidiertes humanes Stratum corneum (n=5-7) (Spender: weibl., 46 J., Abd.)

führt ein Zusatz von 10 % Isopropylalkohol zur wasserhaltigen hydrophilen Salbe zu einer Erhöhung der Hydrocortison-Permeation (Abb. 4.2). Die Kombination von Isopropylmyristat und Isopropylalkohol erhöht die Permeation noch einmal deutlich. So kann mithilfe dieser

	Flux J [g/cm ² *s]*10 ⁻¹¹	PerSol- Koeffizient Z [cm/s]*10 ⁻⁷
Wasserhaltige hydrophile Salbe	0,56 +/- 0,04	50,87 +/- 0,41
Wasserhaltige hydrophile Salbe 5% Isopropylmyristat	0,38 +/- 0,04	3,42 +/- 0,034
Wasserhaltige hydrophile Salbe 10% Isopropylalkohol	1,21 +/- 0,38	0,07 +/- 0,02
Wasserhaltige hydrophile Salbe 5% Isopropylmyristat 10% Isopropylalkohol	4,11 +/- 1,28	2,71 +/- 0,08

Tabelle 4.1: Flux und Persol-Koeffizient der untersuchten Systeme (Mittelwert +/- Standardabweichung)

Additiva beziehungsweise deren Kombination die Permeationsrate für Hydrocortison sowohl gesteigert als auch verringert werden. Die Kombination aus Isopropylmyristat und Isopropylalkohol beeinflusst das Stratum corneum hingegen mit einem synergistischen Effekt. Tabelle 4.1 listet die Permeationsdaten der untersuchten Formulierungen auf. Da für die Permeationen Zubereitungen mit einem Hydrocortisonanteil von 1 % eingesetzt worden sind, ist an den Werten für die Sättigungskonzentration von Hydrocortison in den jeweiligen Formulierungen ersichtlich (Tabelle 4.3), dass alle Vehikel Suspensionsformulierungen gewesen sind. Während die Fluxdaten, die über die Steigung der Kurven ermittelt werden, die Rangfolge der Kurven zueinander wiedergeben, berücksichtigen die PerSol-Koeffizienten zusätzlich die Sättigungskonzentration von Hydrocortison in den jeweiligen Formulierungen. Sie stellen, wie in Kapitel 2.1.2.3 beschrieben, den Quotienten aus Flux und Sättigungskonzentration des Arzneistoffes in dem Vehikel dar. Auffällig sind die niedrigen PerSol-Koeffizienten der Formulierungen mit Isopropylalkohol. Da sie mehr Hydrocortison lösen (Tab. 4.3), fällt der Koeffizient geringer aus. Dennoch ist der Koeffizient für die wasserhaltige hydrophile Salbe mit Isopropylmyristat und Isopropylalkohol deutlich höher als der aus der Formulierung, der nur Isopropylalkohol zugesetzt worden war. Hier führt der deutlich höhere Flux zu einem größerem PerSol-Koeffizienten. Neben dem Anteil an

gelöstem Arzneistoff trägt vor allem der Einfluss der Hilfsstoffe auf das Stratum corneum wesentlich zu dem Permeationsergebnis bei.

4.1.1.2 Sättigungskonzentrationen von Hydrocortison in verschiedenen Medien, den Formulierungen und vorbehandeltem Stratum corneum

Wasser	0,028 % (m/m) (DAB Kommentar, 1998)
Isopropylmyristat	0,013 % (m/m)
Isopropylalkohol	2,55 % (m/m)
Isopropylalkohol / Wasser (1/1) (m/m)	6,52 % (m/m)
Isopropylalkohol / Isopropylmyristat (1/1) (m/m)	0,96 % (m/m)

Tabelle 4.2: Sättigungskonzentrationen von Hydrocortison in unterschiedlichen Medien bei 20 °C

wasserhaltige hydrophile Salbe	0,012 % (m/m)
wasserhaltige hydrophile Salbe 5 % Isopropylmyristat	0,012 % (m/m)
wasserhaltige hydrophile Salbe 10 % Isopropylalkohol	0,170 % (m/m)
wasserhaltige hydrophile Salbe 10 % Isopropylalkohol / 5 % Isopropylmyristat	0,170 % (m/m)

Tabelle 4.3: Sättigungskonzentrationen von Hydrocortison in wasserhaltiger hydrophiler Salbe mit verschiedenen Zusätzen bei 20 °C

Neben dem Lösungsvermögen der Zubereitung für den Arzneistoff ist die Sättigungskonzentration von Hydrocortison im vorbehandelten Stratum corneum von besonderem Interesse. Sie lässt eine Aussage über den Grad der Veränderung durch die Vorbehandlung zu. Zudem kann über das Verhältnis der beiden Sättigungskonzentrationen in Vehikel und Gewebe zueinander eine Abschätzung des Konzentrationsgradienten und damit eine Aussage über das Verteilungsgleichgewicht zwischen Vehikel und Haut gemacht werden. Die Sättigungskonzentrationen von Hydrocortison in Lösungen und Zubereitungen

geben Hinweise auf die Affinität des Arzneistoffes zu diesen Medien. In der Tabelle 4.2 ist im Vergleich zu der Sättigungskonzentration in Wasser eine hohe Löslichkeit von Hydrocortison in Isopropylalkohol aufgeführt. Eine Alkohol/Wasser-Mischung im Verhältnis 1/1 (m/m) ist allerdings in der Lage, noch mehr Hydrocortison zu lösen. Offensichtlich besitzt Hydrocortison zu dieser Mischung die bessere Affinität. Dieses ist auf den Hydrotropieeffekt des Isopropylalkohols in Wasser zurückzuführen. Die Löslichkeit in Isopropylmyristat hingegen ist nicht so hoch wie die in Wasser und auch die Mischung aus gleichen Teilen Isopropylmyristat und Isopropylalkohol löst, dem Alkoholanteil entsprechend, nur etwas mehr Arzneistoff.

Die Hydrocortisonlöslichkeit in den Salben (Tab. 4.3) hängt hingegen nur von der Präsenz des Isopropylalkohols ab. Offensichtlich hält sich das Isopropylmyristat eher in den lipophilen Bereichen des Vehikels auf, während der Alkohol in den hydrophilen Regionen zur Löslichkeit des Hydrocortisons beiträgt.

Demgegenüber steht das Lösungsvermögen des Stratum corneum für Hydrocortison (Tab. 4.4). Isopropylmyristat verursacht eine Reduktion der Hydrocortison Rückstände im Stratum corneum, verglichen mit den Werten bei Vorbehandlung mit wasserhaltiger hydrophiler Salbe ohne Additiva (Abb. 4.3b). Dieses weist auf eine Interaktion von Stratum corneum Komponenten mit Isopropylmyristat hin.

Stratum corneum 1 (weibl., 46 J., Brust)		Stratum corneum 2 (weibl., 46 J., Abd.)	
wasserhaltige hydrophile Salbe	8,70 +/-2,56	wasserhaltige hydrophile Salbe / 10 % Isopropylalkohol	9,75 +/-3,44
wasserhaltige hydrophile Salbe / 5 % Isopropylmyristat	0,78 +/-0,26	wasserhaltige hydrophile Salbe / 10 % Isopropylalkohol / 5 % Isopropylmyristat	8,76 +/-3,25

Tabelle 4.4: Sättigungskonzentration von Hydrocortison in Stratum corneum, das mit unterschiedlichen Formulierungen vorbehandelt wurde (jeweils n=6) [$\mu\text{g} / \text{cm}^2$] bei 32 °C

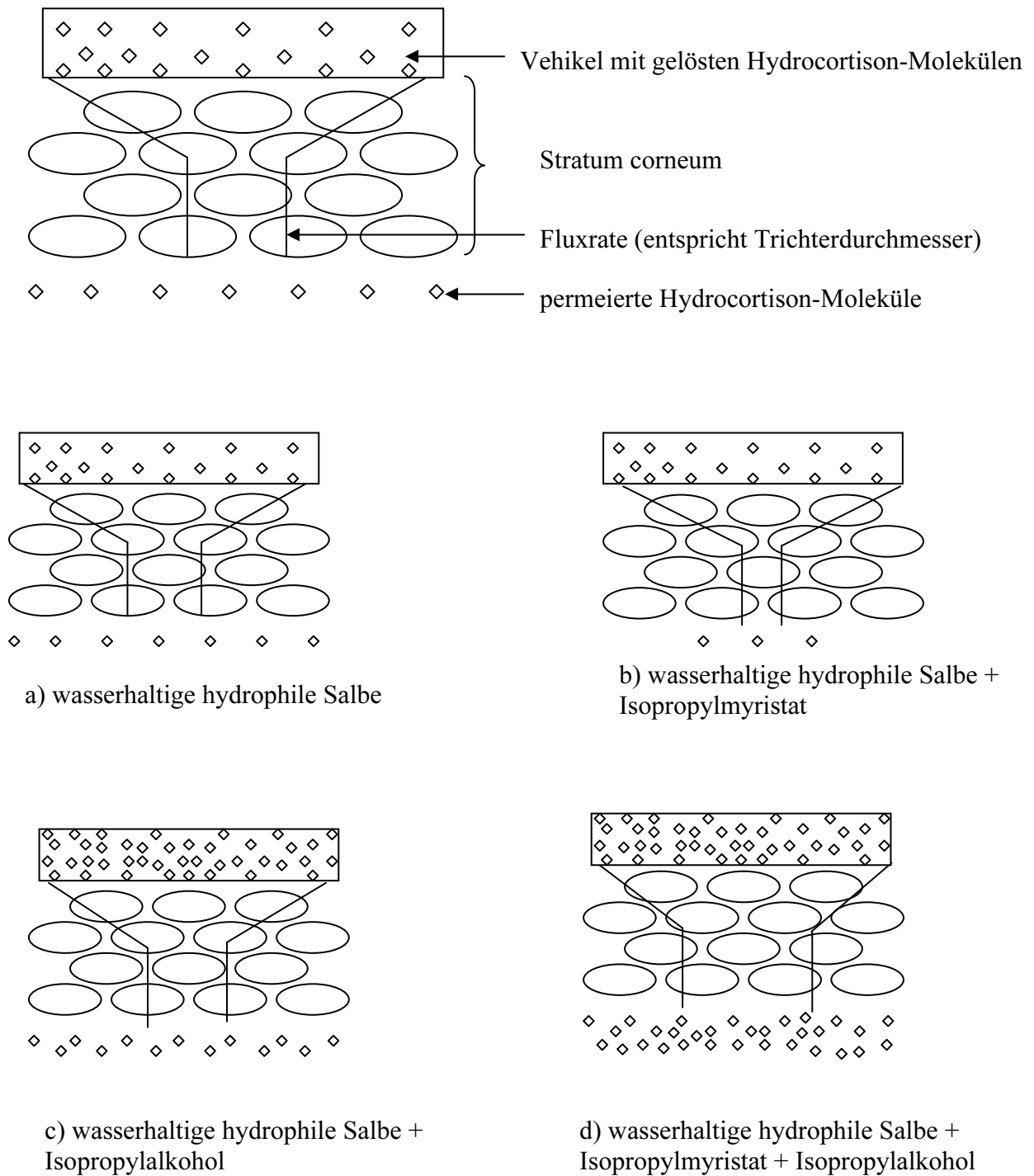


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Permeationen und den Sättigungskonzentrationen (nach Surber und Davis, 2002)

Bei der Hydrocortison-Permeation aus wasserhaltiger hydrophiler Salbe mit dem Isopropylmyristat-Zusatz nimmt das Stratum corneum aufgrund der geringen Konzentration an gelöstem Hydrocortison im Vehikel (niedrige Sättigungskonzentration) weniger Hydrocortison auf und die permeierte Menge an Hydrocortison ist niedriger im Vergleich zu der Permeation mit wasserhaltiger hydrophiler Salbe.

Im Gegensatz dazu führt ein Isopropylalkohol-Anteil zu einer erhöhten Lösungskonzentration an Hydrocortison in der Salbe. Daher steigt die permeierte Menge an, während das Stratum corneum genauso viel Hydrocortison speichert im Vergleich zu der Behandlung mit wasserhaltiger hydrophiler Salbe.

Nach der Behandlung des Stratum corneum mit wasserhaltiger hydrophiler Salbe und der Kombination aus Isopropylmyristat und Isopropylalkohol hat die permeierte Menge weiter zugenommen, obwohl die Sättigungskonzentrationen im Vehikel und im Stratum corneum konstant geblieben sind. Daraus ist abzuleiten, dass das Stratum corneum selbst in seinem strukturellem Aufbau verändert worden ist.

In Abbildung 4.3 sind die Zusammenhänge, die sich aus den Permeationsergebnissen und den Bestimmungen der Sättigungskonzentrationen ergeben, schematisch dargestellt. Dabei repräsentiert die Anzahl der Moleküle im Vehikel die Sättigungskonzentration, der Trichterdurchmesser repräsentiert die Fluxrate.

4.1.1.3 Thermoanalytische Untersuchungen von vorbehandeltem Stratum corneum

Die dynamische Differenzkalorimetrie ist eine Analysenmethode, um die interzellularen Lipide des Stratum corneum zu charakterisieren. Van Duzee (1975) beobachtete vier Umwandlungen des Stratum corneum, bei 40 °C und 75 °C als Umwandlungstemperaturen von Lipidfraktionen, bei 85 °C die Denaturierung von α -Keratin und bei 105 °C die Denaturierung von nichtfibrillärem Protein. Nur die beiden Umwandlungen der Lipidfraktionen sind reversibel. Wie von Golden et al. (1987a) beschrieben, ist die Interpretation des Peaks bei 85 °C etwas komplexer. Dieser Peak beinhaltet Charakteristika von Proteinen und auch Lipiden. Nach Temperaturerhöhung ist er einerseits nicht reversibel, was auf Proteinstrukturen hinweist, aber andererseits verhält er sich typisch für Lipide, da er nach der Behandlung mit Lipidsolventien kleiner wird und bei Erhöhung der Hydratation

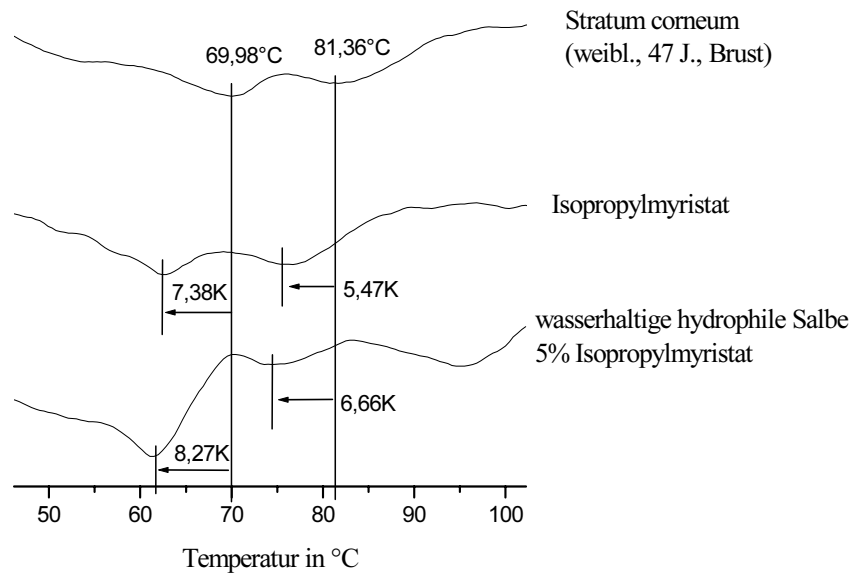


Abbildung 4.4: Thermogramme von Stratum corneum im Vergleich mit entsprechend vorbehandeltem Gewebe

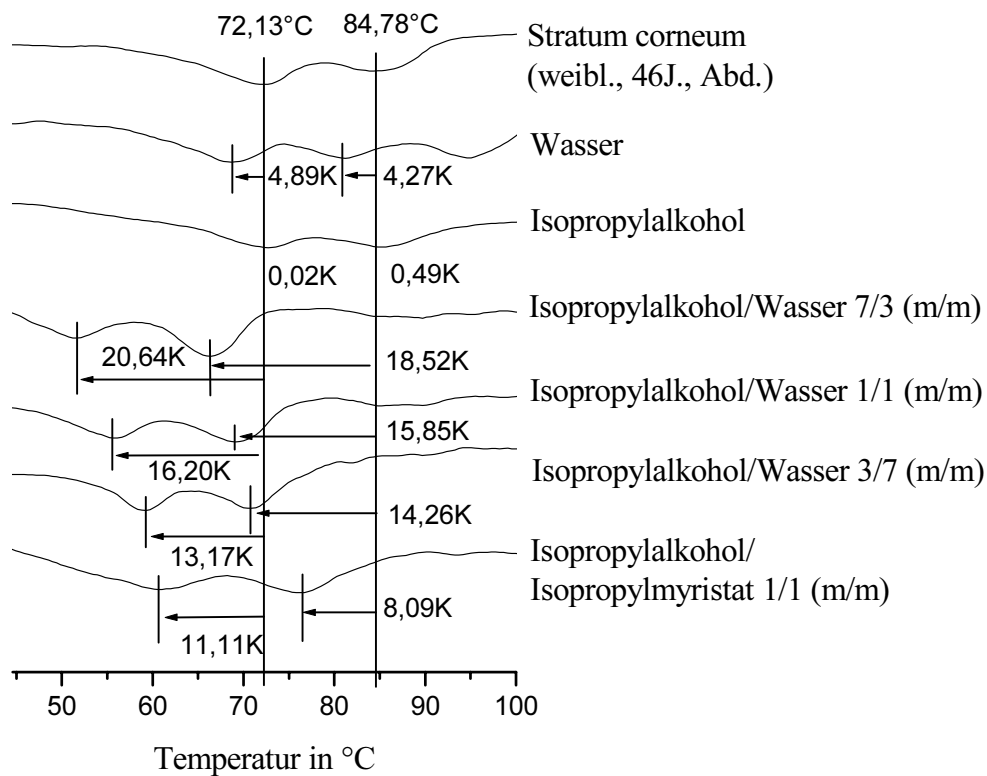


Abbildung 4.5: Thermogramme von Stratum corneum im Vergleich mit entsprechend vorbehandeltem Gewebe

einen Shift zu niedrigeren Temperaturen hin erfährt. Aus diesem Grunde wird für diesen Peak ein Komplex aus Membranproteinen der Korneocyten und interzellulären Lipide verantwortlich gemacht.

Die erste Umwandlung bei 40 °C ist nicht mit jeder Probe zuverlässig zu detektieren und eignet sich deshalb nicht zum Vergleich der Thermogramme. Die letzte Umwandlung bei 105 °C benötigt einen Mindest-Hydratisierungsgrad des Stratum corneum, um visualisiert zu werden. Deshalb werden in dieser Arbeit nur die beiden thermischen Umwandlungen betrachtet, die zuverlässige Informationen über Interaktionen zwischen Vehikel und Lipidstrukturen des Stratum corneum zulassen. Abhängig von der Körperregion und des Spenders schwanken die Werte für die beiden Umwandlungen zwischen 70 und 72 °C bzw. 81 und 84 °C. Dabei ist zu beachten, dass eine Verschiebung um weniger als 3 K als nicht relevant angesehen wird (Leopold und Lippold, 1995). Dieses hängt mit einer gewissen Ungenauigkeit der Temperaturfühler im Gerät und der Bestimmungsmethode zur Ermittlung der tiefsten Temperatur des Peaks zusammen. Da nur die Lage der Peaks und nicht ihre Größe bewertet wird, kann in diesem Zusammenhang auf die Darstellung der Ordinate, die die Menge an Energie aufführt, verzichtet werden.

Abbildung 4.4 demonstriert den Einfluß von Isopropylmyristat auf Stratum corneum im Vergleich zu Isopropylmyristat-haltiger wasserhaltiger hydrophiler Salbe. Normalerweise gibt ein Shift der Umwandlungstemperatur zu niedrigeren Temperaturen hin eine erhöhte Unordnung der Lipidbilayer wieder (Hirvonen et al, 1995) und weist auf eine Invasion einer Fremdsubstanz in die Lipidstrukturen hin. Die Erniedrigung der Umwandlungstemperatur ist näherungsweise gleich nach Vorbehandlung mit Formulierung und reinem Isopropylmyristat. Daraus kann geschlossen werden, dass Isopropylmyristat und nicht die Hilfsstoffe der wasserhaltigen hydrophilen Salbe für den Shift der Umwandlungstemperatur verantwortlich ist. Dieses stimmt mit Ergebnissen von Refai (2001) überein. Hier wurde kein Einfluss verschiedener Creme-Basen, inklusive der wasserhaltigen hydrophilen Salbe, auf die Umwandlungstemperaturen dieser Stratum corneum-Lipidfraktionen festgestellt. Dieser Befund kann mit Blick auf die Permeationsergebnisse zunächst aber nur im Sinne einer Interaktion von Isopropylmyristat mit der Stratum corneum-Struktur verstanden werden. Welcher Art diese Interaktion ist, bleibt zunächst unklar.

Im Gegensatz dazu beeinflusst Isopropylalkohol die Umwandlungstemperaturen des Stratum corneum nur in wässriger Lösung. Mit steigendem Anteil an Alkohol erhöhen sich die Shifts beider Umwandlungen (Abb. 4.5). Offensichtlich wird für die Effektivität des Isopropylalkohols eine Hydratation des Stratum corneum benötigt. In der Abbildung ist

weiterhin der Effekt einer Vorbehandlung von Stratum corneum mit Wasser aufgeführt. Allein die Hydratisierung des Stratum corneum beeinflusst die Lipidfraktionen dahingehend, dass sich deren Umwandlungstemperaturen erniedrigen.

Die Kombination von Isopropylmyristat mit Isopropylalkohol beeinflusst beide Shifts in höheren Maße als die Einzelsubstanzen. Dennoch fallen diese nicht so hoch wie die der Alkohol-Wasser-Mischungen aus. Auch dieses Ergebnis lässt auf einen synergistischen Effekt der Kombination Isopropylmyristat/Isopropylalkohol auf die Stratum corneum-Lipide schließen.

4.1.1.4 Röntgenuntersuchungen von vorbehandeltem Stratum corneum

a) Röntgenweitwinkelmessung

Stratum corneum	0,371	0,413	0,467 (schwach)
Isopropylmyristat	0,368	0,405	/
Isopropylalkohol / Wasser (1/1) (m/m)	0,368	0,411	0,467 (schwach)
Isopropylalkohol / Isopropylmyristat (1/1) (m/m)	/	0,410	/

Tabelle 4.5: Röntgenweitwinkelinterferenzen von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich mit vorbehandeltem Gewebe [nm] (Spender: weibl., 46 J., Abd.)

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse der Röntgenweitwinkelmessungen von vorbehandeltem Stratum corneum mit Isopropylmyristat, einer Alkohol/Wasser-Mischung und der Kombination aus Isopropylalkohol und Isopropylmyristat dargestellt. Unbehandeltes Stratum corneum zeigt in der Regel drei Interferenzen, welche zu den jeweiligen kristallisierten Lipidfraktionen gehören. Orthorhombisch gepackte Lipide besitzen eine starke Interferenz von 0,371 nm. Eine weitere starke Interferenz bei 0,413 nm ist den hexagonal geordneten Lipiden zugeordnet. Diese Interferenz reflektiert die laterale Packung der Hydrocarbonreste der Lipide (Elias et al., 1983). Die dritte meist sehr schwache Interferenz von 0,467 nm wird durch Lipide verursacht, die an den Korneozyten gebunden sind (Bouwstra, 1992a). Der Vergleich der Interferenzen von unbehandelten und vorbehandelten Stratum corneum-Proben gibt direkte Hinweise auf die Einflüsse der Additiva auf den Nahordnungsbereich der unterschiedlichen Fraktionen.

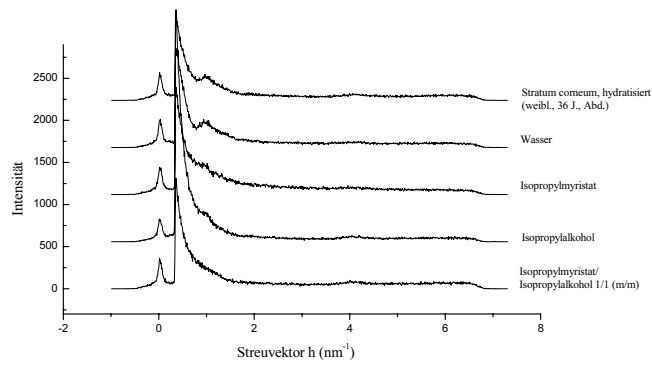
Die Interferenz der orthorhombisch gepackten Lipide mit 0,371 nm wird weder durch die Vorbehandlung mit reinem Isopropylmyristat noch durch die Isopropylalkohol/Wasser-Mischungen beeinflusst, während die Kombination von Isopropylmyristat mit Isopropylalkohol zu einem Ausbleiben dieser Interferenz führt. Durch die Vorbehandlung wird die Lipidfraktion offensichtlich aufgelöst und ist dann nicht mehr detektierbar.

Hexagonal gepackte Lipide haben eine Interferenz von 0,413 nm. Diese Lipidfraktion wird durch Isopropylmyristat, deutlich auf 0,405 nm verringert. Dieses Ergebnis einer offensichtlich dichteren Packung der Lipide reflektiert die Abnahme der Hydrocortison-Permeabilität des Stratum corneum nach Vorbehandlung mit Isopropylmyristat-haltiger Formulierung.

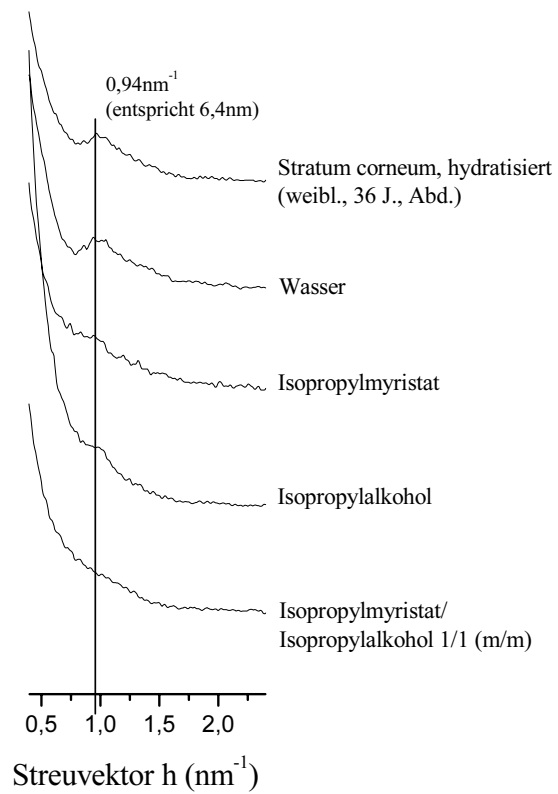
Die Interferenz bei 0,467 nm hervorgerufen durch Lipide, die an den Korneozyten gebunden sind, verschwindet nach Vorbehandlung sowohl mit Isopropylmyristat als auch mit der Kombination aus Isopropylalkohol und Isopropylmyristat. Damit wäre eine Fluidisierung dieser Lipidfraktion möglich, die auch im Einklang mit den kalorimetrischen Daten stehen würde (Kap. 4.1.1.3). Alternativ müsste auch eine partielle Herauslösung dieser Lipidfraktion in Betracht gezogen werden.

b) Röntgenkleinwinkelmessung

Mittels der Röntgenkleinwinkelbeugung lässt sich die Fernordnung von Lamellarschichten, messen. Röntgenkleinwinkelmessungen an Stratum corneum ergeben eine Interferenz von etwa 6,4 nm (Abb. 4.6 und 4.7). Dieses steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Bouwstra 1991a, b). Wasser selber ist zur Lipid-Kristallisation nicht notwendig, es fördert aber die ordnenden Effekte von Proteinen und Lipid-Mikrostrukturen (van Duzee, 1975). Aus diesem Grunde sind die Messungen mit den Stratum corneum-Proben, die mit Isopropylmyristat und der Kombination aus Isopropylmyristat und Isopropylalkohol vorbehandelt wurden, mit hydratisiertem Stratum corneum durchgeführt worden (Abb.4.6). Vor allem in Abb. 4.6 b) ist die stabilisierende Funktion von Wasser auf die Lamellarphase im Interzellularraum zu erkennen. Die Interferenz bei 6,4 nm wird in diesem Falle verstärkt. Die Intensität der Interferenz von Stratum corneum, vorbehandelt mit Isopropylmyristat, ist etwas geringer verglichen mit unbehandeltem Stratum corneum.



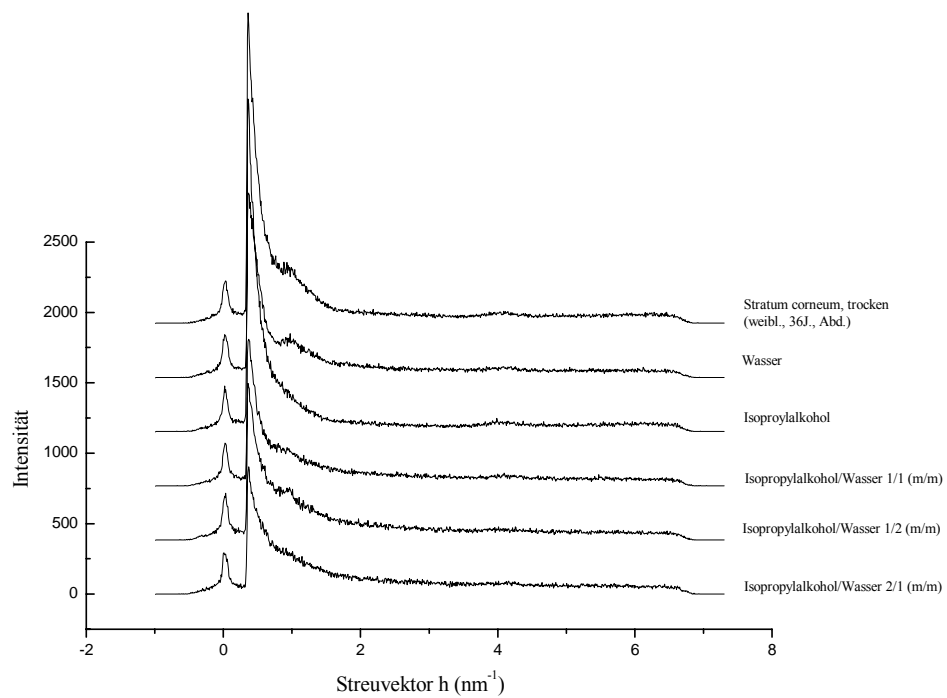
a)



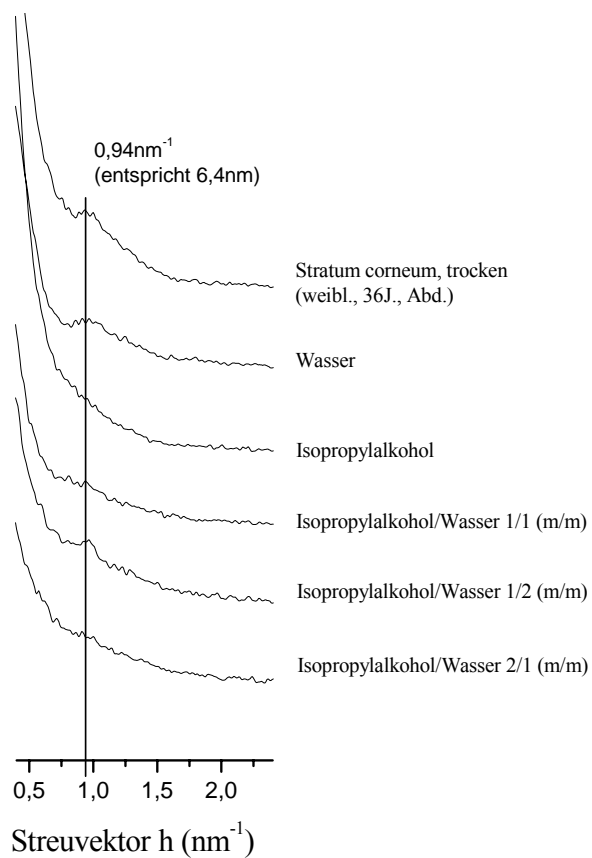
b)

Abbildung 4.6: Röntgenkleinwinkeldaten von Stratum corneum mit und ohne Vorbehandlung;

a) Original-Daten; b) vergrößerter Ausschnitt nach mathematischer Glättung der Kurven



a)



b)

Abbildung 4.7: Röntgenkleinwinkel Daten von Stratum corneum mit und ohne Vorbehandlung;

a) Original-Daten; b) vergrößerter Ausschnitt nach mathematischer Glättung

Die Vorbehandlung mit der Kombination aus Isopropylmyristat und Isopropylalkohol führt zu dem Ausbleiben der Interferenz bei 6,4 nm. Um abzuklären, ob dieses Ergebnis allein durch den Alkohol oder in Kombination mit Wasser verursacht wird, sind die Messungen mit getrocknetem Stratum corneum in wässrigen Alkohollösungen durchgeführt worden. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich eine Reduktion der Interferenz in Abhängigkeit von der Höhe des Alkoholgehaltes feststellen (Abb. 4.7). Dennoch wird das Signal durch die Vorbehandlung mit Wasser alleine nicht beeinflusst und bleibt erst komplett nach Vorbehandlung mit reinem Isopropylalkohol aus. Isopropylalkohol diffundiert demnach in die Lamellarphasen des Stratum corneum und führt dort zu einer Auflösung der Ordnung. Die Störung der Lipid-Mikrostruktur nach der Vorbehandlung mit der Kombination aus Isopropylalkohol und Isopropylmyristat kann demnach lediglich auf den Anteil an Isopropylalkohol zurückgeführt werden. Infolgedessen ist nur für Isopropylalkohol eine Beeinflussung des Stratum corneum im Kleinwinkel-Bereich nachweisbar.

4.1.1.5 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluss von Isopropylmyristat, Isopropylalkohol und deren Kombination auf humanen Stratum corneum

Um den Wirkungsmechanismus von Isopropylmyristat auf die Stratum corneum-Lipide besser untersuchen zu können, wurden neben kalorimetrischen auch röntgenometrische Messungen durchgeführt. Die Röntgenklein- und Röntgenweitwinkelmessungen geben Hinweise auf den Zustand der Lipidfraktionen im Nah- und Fernbereich. Während Röntgenkleinwinkelmessungen eine Störung der lamellaren Packung nach Vorbehandlung mit Isopropylmyristat zeigen, demonstrieren entsprechende Röntgenweitwinkeldata einen kompletten Verlust der Ordnung von Korneozyten-gebundenen Lipidfraktionen und eine Erniedrigung der lateralen Packungsdistanz hexagonal geordneter Lipide. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist eine Insertion von Isopropylmyristat in Stratum corneum-Lipide, die diese beiden Fraktionen betrifft, denkbar. Der Ordnungsverlust der Lipide, die an die Korneozyten gebunden sind, geht in der dynamischen Differenzkalorimetrie mit einem Shift der Umwandlungstemperatur von 80 °C auf etwa 75 °C einher, während sich eine Änderung der Mikrostruktur hexagonal geordneter Lipide mit einem Shift von 70 °C auf 60 °C bemerkbar macht. Dieses wird mit einem Ordnungsverlust und einer erhöhten Fluidität erklärt (Leopold und Lippold, 1995). Dennoch führt die Insertion von Isopropylmyristat zwischen die Kohlenwasserstoff-Reste zu einer dichter gepackten Lipidordnung und letztendlich höheren Permeationsbarriere. Offensichtlich geht die Verstärkung der Barriererefunktion mit einem

Ordnungsverlust der Lipide, die an die Korneozyten gebunden sind, einher (Abb. 4.8 b). Betrachtet man nun diese strukturellen Aspekte zusammen mit der niedrigen Hydrocortisonlöslichkeit in mit Isopropylmyristat vorbehandeltem Stratum corneum, so resultiert daraus eine niedrige Hydrocortison-Permeationsrate, obwohl die Hydrocortison-Verfügbarkeit aus der Formulierung selber nicht verändert wurde.

Im Gegensatz zu Shahi und Zatz (1978), in deren Studie Isopropylalkohol zwar die Hydrocortison-Löslichkeit erhöht, während der Flux mit steigender Alkoholkonzentration sinkt, erhöht sich nach der Addition von Isopropylalkohol zur wasserhaltigen hydrophilen Salbe die Hydrocortison-Permeation signifikant. Dafür sind mehrere Erklärungen möglich. Zum einen können durch den Alkohol die Barriereigenschaften des Stratum corneum verändert werden. Zum anderen kann eine Übersättigung des Hydrocortisons in der Formulierung durch die Zugabe an Isopropylalkohol eine höhere Freisetzungsrates aus dem Vehikel verursachen. Im letzteren Falle sollte eine höhere Löslichkeit des Arzneistoffes in der Formulierung nicht allein die Permeationsrate verändern, da die Stratum corneum Barriere nachweisbar geschwindigkeitsbestimmend ist. Tatsächlich verändert Isopropylalkohol nicht die Hydrocortisonlöslichkeit im Stratum corneum und auch die Röntgenweitwinkelergebnisse von mit Isopropylalkohol vorbehandeltem Stratum corneum entsprechen den Daten für unbehandeltes Stratum corneum.

Die Ergebnisse der Kapitel 4.1.1.3 und 4.1.1.4 b) hingegen geben Anhaltspunkte, die zur Aufklärung der Wirkungsweise von Isopropylalkohol beitragen. Bei Vorbehandlung mit reinem Isopropylalkohol bleibt die Interferenz von 6,4 nm in der Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie aus. Sie verliert an Intensität mit steigendem Alkoholgehalt in den Alkohollösungen. Kalorimetrische Daten zeigen einen weiteren Effekt des Isopropylalkohols und seiner Verdünnungen auf die Stratum corneum Lipide. Reiner Isopropylalkohol beeinflusst die thermischen Umwandlungen der Stratum corneum-Lipide nicht. Die Umwandlungstemperaturen verschieben sich nur in Gegenwart von Wasser, wobei die Shifts auch hier mit steigendem Alkohol-Anteil größer werden. Offensichtlich ist eine gewisse Hydratation des Stratum corneum für die Interaktion von Isopropylalkohol mit den Lipiden nötig. Das steht im Einklang mit Arbeiten anderer Autoren, die von einer lateralen Schwellung der Lipide durch Wasser, einer Insertion in die Kopfgruppen der Lipidregionen (Golden et al., 1987a) oder einer Hydratation der polaren Proteinregionen (Barry, 1987) ausgehen. Barry (1987) und Bouwstra (1991c) nehmen zwar auch eine geringere Ordnung der Lipidfraktionen an, aber keine Schwellung der Lipide durch Wassereinlagerung in die Lipidkopfgruppenregion. Aus den Ergebnissen der vorhergehenden Kapitel ist von einer

lateralen Expansion der hydrophilen Zwischenräume mit Wasser auszugehen. Dieses ermöglicht wiederum eine Invasion von Isopropylalkohol von den hydrophilen in die lipophilen Zwischenräume. Insgesamt führt Isopropylalkohol zu einer erhöhten Fluidität der lipophilen Alkylketten mit einer daraus resultierenden Depression der Schmelzpunkte der kristallisierten Lipidfraktionen (Abb.4.8 c). Letztendlich ist damit die Hydrocortisondiffusion durch das Stratum corneum leichter und die Permeation schneller, obwohl die Hydrocortisonlöslichkeit im Stratum corneum kaum verändert wurde.

Der Zusatz von Isopropylmyristat und Isopropylalkohol zur wasserhaltigen hydrophilen Salbe verursacht die höchste Permeationsrate von allen untersuchten Formulierungen. Offensichtlich haben diese Additiva einen synergistischen Effekt, obwohl die Sättigungskonzentration von Hydrocortison in der Salbe im Vergleich zur wasserhaltigen hydrophilen Salbe mit Isopropylalkohol nicht erhöht wird. Dennoch führt die Kombination dieser beiden Hilfsstoffe in der Formulierung, verglichen mit der wasserhaltigen hydrophilen Salbe ohne Zusätze, zu einem erhöhten Anteil an gelöstem Hydrocortison. Die Sättigungslöslichkeit im Stratum corneum zeigt nach Vorbehandlung mit der Formulierung, die Isopropylalkohol und Isopropylmyristat enthielt, keinen Unterschied im Vergleich zur Hydrocortisonlöslichkeit im Stratum corneum vorbehandelt mit einer Formulierung, der nur Isopropylalkohol zugesetzt war. Offensichtlich wird der erniedrigende Effekt von Isopropylmyristat auf die Hydrocortisonlöslichkeit im Vehikel und daraus resultierend der Diffusionskoeffizient von Hydrocortison im Stratum corneum durch den Isopropylalkohol verhindert.

Nur die kalorimetrischen Daten in Verbindung mit der Röntgendiffraktometrie weisen auf eine Erhöhung der Fluidität des Stratum corneum nach Vorbehandlung mit der Formulierung, die mit Isopropylmyristat und Isopropylalkohol angereichert worden war, hin. Die Daten der Differential Scanning Calorimetry zeigen Shifts der Umwandlungstemperaturen auf, die allerdings nicht höher als nach Vorbehandlung mit den wässrigen Alkohollösungen sind. In den Röntgenweitwinkelergebnissen bleiben außerdem die Interferenzen, die für die orthorhombisch geordneten Lipide und die an den Korneozyten gebundenen Lipide stehen, komplett aus. Mit der Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie kann ebenfalls eine Fluidisierung

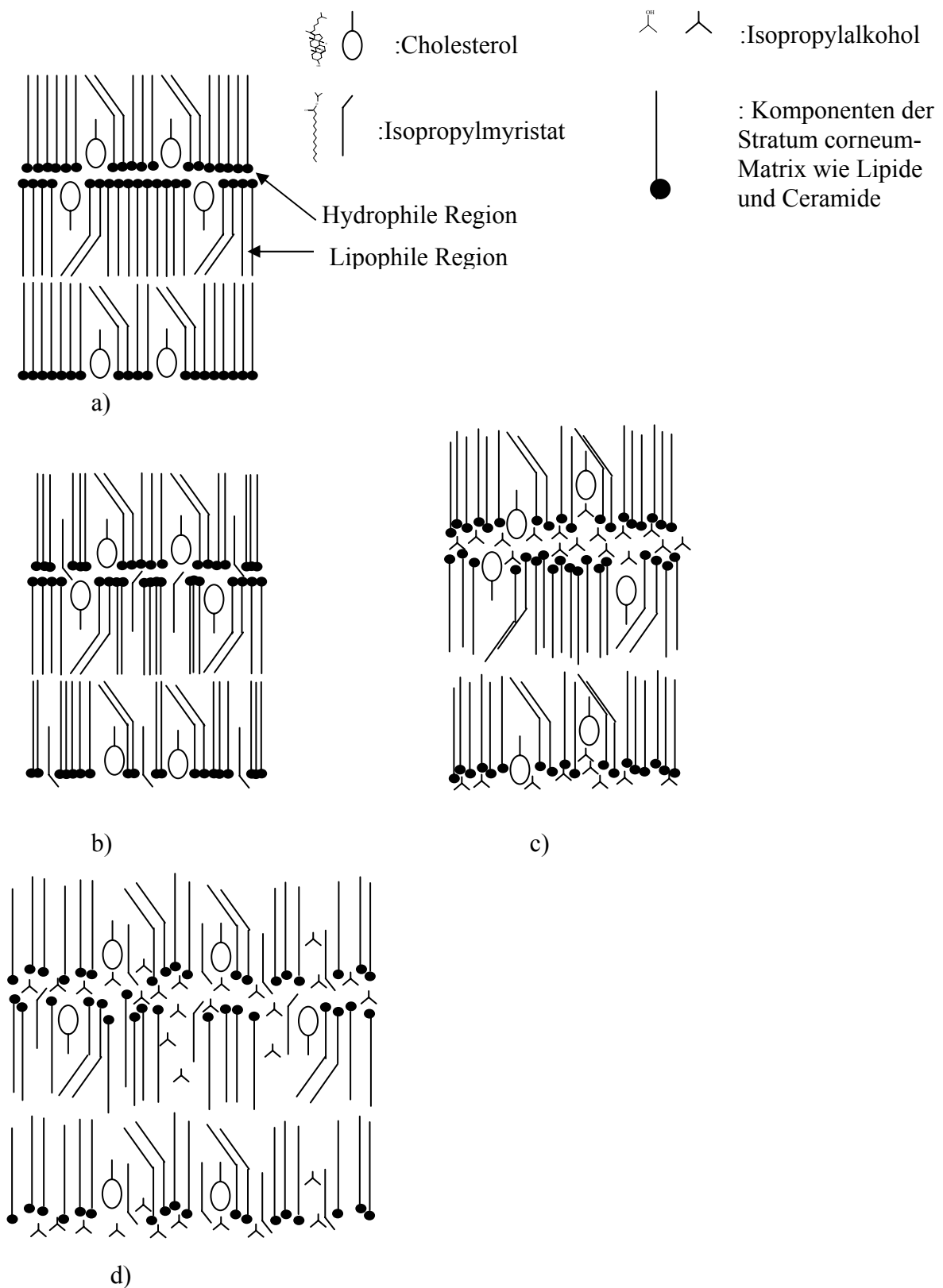


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der Wirkungsmechanismen: a) unbehandeltes Stratum corneum; Vorbehandlung mit b) Isopropylmyristat; c) Isopropylalkohol; d) Kombination aus Isopropylmyristat und Isopropylalkohol

detektiert werden. Demnach fluidisiert die Kombination von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat die Mikrostruktur des Stratum corneum stärker als reiner Alkohol (Abb. 4.8 d). Dadurch sind die Arzneistoff-Moleküle in der Lage, noch schneller durch das Stratum corneum zu diffundieren, als aus einer Formulierung, der lediglich Isopropylalkohol zugesetzt worden ist.

4.1.2 Vergleich hydrocortisonhaltiger Fertigarzneimittel

Auf dem Arzneimittelmarkt wird eine Vielzahl an Hydrocortison-Topika vertrieben. Mit der Soventol® Creme HC existiert nun ein Beispiel, mit dem eine Permeationssteigerung von Hydrocortison-Acetat durch bestimmte Hilfsstoffe erreicht wird und es stellt sich die Frage, ob nicht auch unter den Hydrocortison-Fertigarzneimitteln eine Permeationsförderung möglich ist. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Fertigarzneimitteln erzielt worden sind, vorgestellt.

4.1.2.1. Permeationen von Hydrocortison aus Fertigarzneimitteln

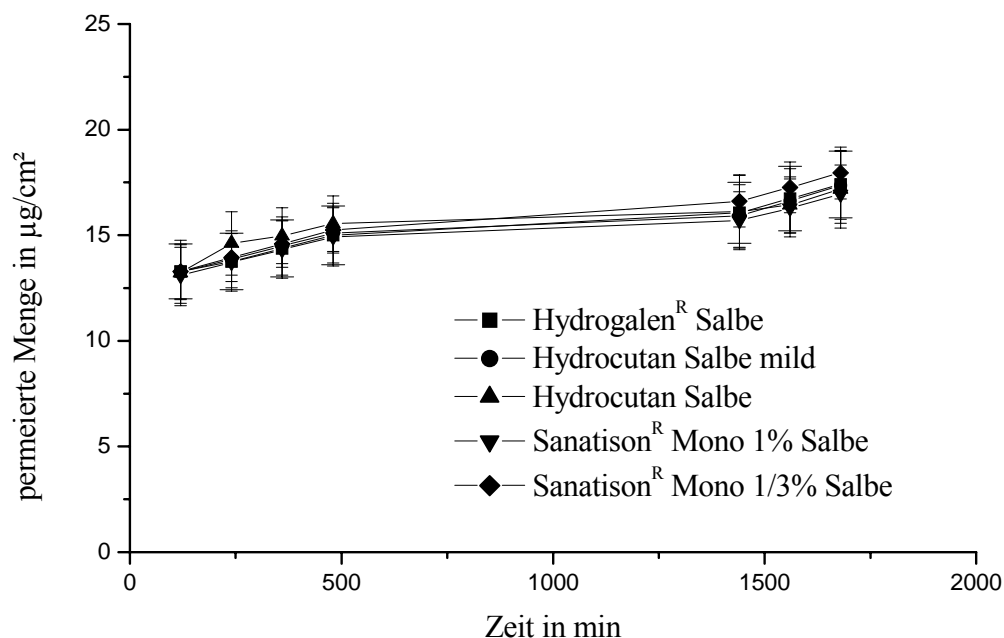


Abbildung 4.9: Permeationskurven von Fertigarzneimittel-Salben (n=6) (Spender: weibl., 50 J., Abd.)

Die in Kapitel 3.4 aufgelisteten Präparate wurden hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens untersucht. Wie in den Abbildungen 4.9 für die Salben und 4.10 für die Cremes ersichtlich, weichen die Permeationskurven der Hydrocortison-Formulierungen nur geringfügig voneinander ab. Auffällig ist, dass die permeierte Menge Hydrocortison schon nach 2 Stunden einen recht hohen Wert hat, die Kurve dann aber nur langsam ansteigt. Um einen Vergleich mit anderen Daten zu ermöglichen, wurde eine Permeation mit wasserhaltiger hydrophiler Salbe, versetzt mit 1 % Hydrocortison, und demselben Stratum corneum aufgenommen (Abb. 4.11).

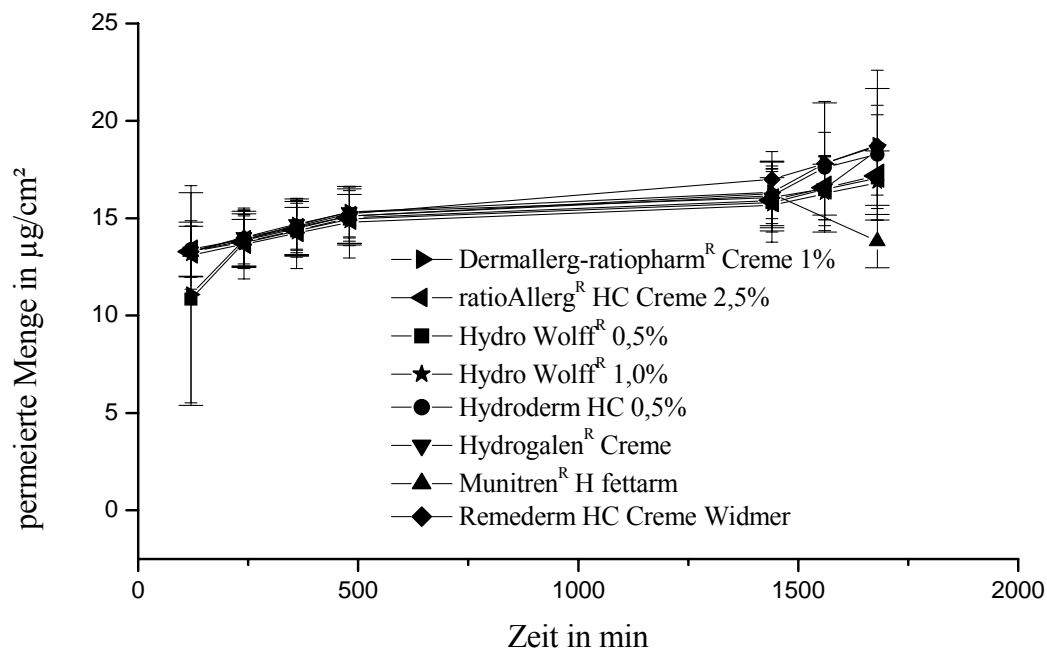


Abbildung 4.10: Permeationskurven von Fertigarzneimittel-Cremes (n=6) (Spender: weibl., 50 J., Abd.)

Da sich derselbe Permeationsverlauf ergibt, muß im Vergleich mit anderen Hydrocortison-Permeationen (siehe auch Abb. 4.1) und Refai (1998) von einer starken interindividuellen Variabilität der Hautspenden ausgegangen werden. Eine Beschädigung der Stratum corneum-Barriere kann hingegen ausgeschlossen werden. Dieses müsste spontane oder unregelmäßige Ergebnisse liefern, alle Kurven liegen aber im gleichen Bereich.

Insgesamt kann demnach keine der getesteten Formulierungen die Stratum corneum-Barriere modifizieren.

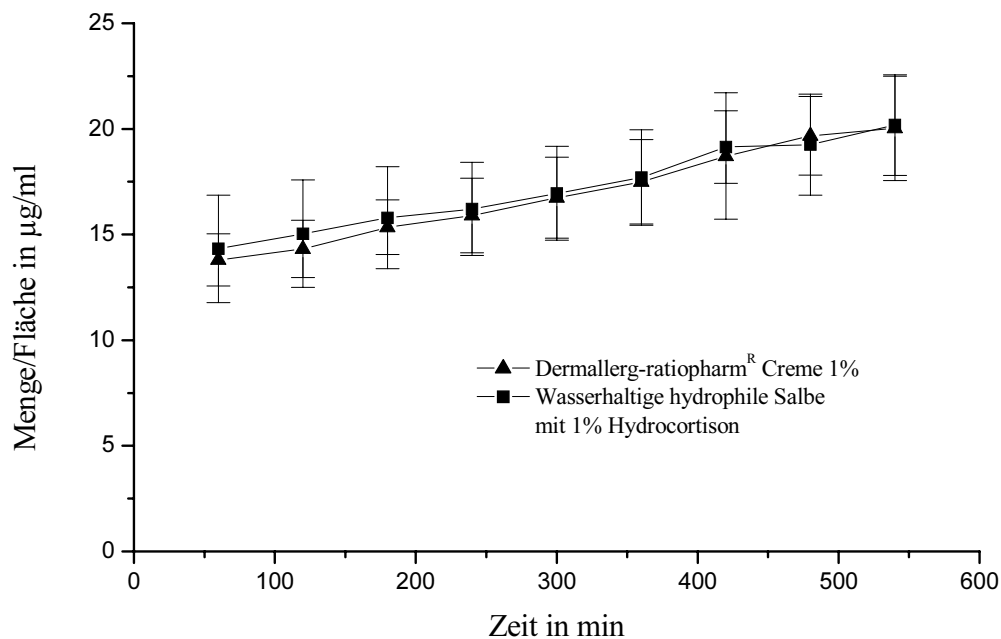


Abbildung 4.11: Permeationen von Dermallerg-ratiopharm® Creme 1% und wasserhaltiger hydrophiler Salbe (n=6) (Spender: weibl., 50 J., Abd.)

	Flux J [g/cm ² *s]*10 ⁻¹²	PerSol-Koeffizient Z [cm/s]*10 ⁻¹⁰
Dermallerg-ratiopharm® Creme 1%	30,93 +/- 6,42	12,37 +/- 2,57
Hydrocutan Salbe mild 0,1 %	32,25 +/- 8,34	43,00 +/- 11,12
Hydrocutan Salbe 1,0 %	34,53 +/- 5,25	46,04 +/- 7,00

Tabelle 4.6: Permeationsdaten von verschiedenen Hydrocortison-Fertigarzneimitteln

Alle untersuchten Fertigarzneimittel sind mikroskopisch als Suspensionsformulierungen eingeordnet worden, so dass für die Ermittlung der PerSol-Koeffizienten die Bestimmung der Sättigungskonzentration in dem jeweiligen Vehikel nötig ist. Für zwei der Fertigarzneimittel wurde jeweils Placeboformulierung zur Verfügung gestellt, so dass dafür Permeationsdaten

berechnet werden konnten. Wie in Tabelle 4.6 ersichtlich, weichen die Werte für den Flux der Permeation nur geringfügig voneinander ab. Unter Berücksichtigung der gelösten Hydrocortison-Konzentration in der jeweiligen Formulierung ist dennoch ein Unterschied der Formulierungen zu vermuten. Die PerSol-Koeffizienten der Hydrocutan-Salben unterscheiden sich von dem der Dermallerg Ratiopharm Creme um den Faktor 3,6. Um also Produkte hinsichtlich ihres Einflusses auf die Haut vergleichen zu können, ist die gelöste Konzentration an Arzneistoff zu berücksichtigen.

4.1.2.2 Thermoanalytische Untersuchungen von vorbehandeltem Stratum corneum

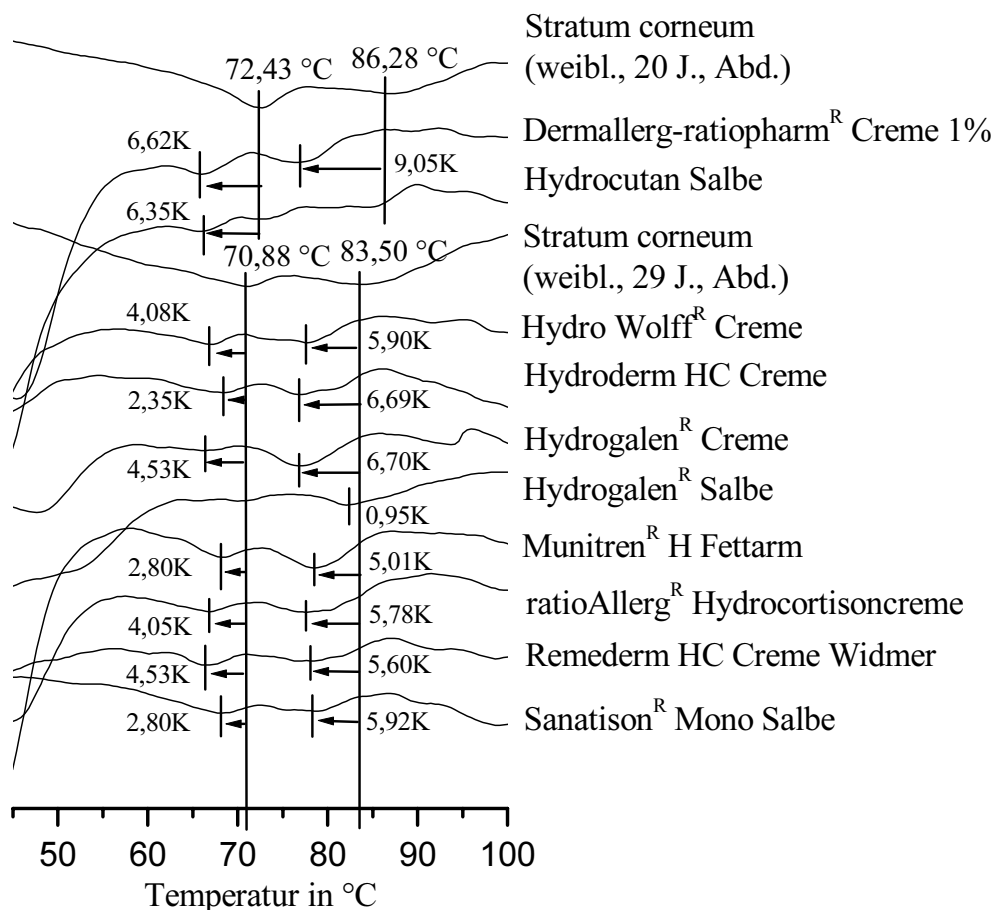


Abbildung 4.12: Thermogramme von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich mit Proben, die mit verschiedenen Hydrocortison-Fertigarzneimitteln vorbehandelt worden waren

Signifikante Verschiebungen der Umwandlungstemperatur in der Differential Scanning Calorimetry sind aufgrund interindividueller Variabilitäten und einer gewissen Messungenauigkeit des Gerätes erst ab etwa 3K zu bewerten. In Abb. 4.12 sind die Thermogramme der Stratum corneum-Proben, die mit Hydrocortison-Fertigarzneimitteln vorbehandelt wurden, aufgeführt. Aufgrund der Anzahl an zu untersuchenden Zubereitungen ist mit zwei verschiedenen Spendern gearbeitet worden. Der Vergleich der beiden Thermogramme der unbehandelten Proben demonstriert die mögliche Variabilität in der Peaklage. Der Peak bei etwa 71 °C bzw. 72 °C wird vor allem durch die Vorbehandlung mit Dermallerg-ratiopharm[®] Creme 1 %, Hydrocutan Salbe und in geringerem Maße auch von Hydro Wolff[®] Creme, Hydrogalen[®] Creme, ratioAllerg[®] Hydrocortisoncreme und Remederm HC Creme Widmer verschoben. Der Peak bei etwa 84 °C bzw. 86 °C wird von der Dermallerg-ratiopharm[®] Creme 1%, Hydro Wolff[®] Creme, Hydroderm HC Creme, Hydrogalen[®] Creme, Munitren H fettarm, ratioAllerg[®] Hydrocortisoncreme, Remederm HC Creme Widmer und Sanatison[®] Mono Salbe beeinflusst. Das Thermogramm der Hydrocutan Salbe ist hinsichtlich der Interpretation des Peaks bei 86 °C nicht unproblematisch. Da aber die detektierten Peaks sehr gering ausfallen im Vergleich zu dem bei 65,81 °C, wird die Umwandlungstemperatur von 86 °C als nicht modifiziert bewertet. Insgesamt lassen demnach nur die Hydrocutan und die Hydrogalen[®] Salbe diese thermische Umwandlung, die Lipide am cornified envelope betrifft, unverändert.

Bei dem Vergleich der Daten für die jeweiligen Formulierungen lassen sich folgende Zusammenhänge hervorheben: Laut Deklaration bestehen beide Ratiopharm-Produkte aus den gleichen Hilfsstoffen. Es ist aber nicht ersichtlich, ob beide Rezepturen auch mengenmäßig gleich aufgebaut sind. Jedenfalls senken beide Cremes die Umwandlungstemperaturen des Stratum corneum signifikant. Im Vergleich der Hydrocutan Salbe mit der Hydrogalen[®] Salbe ist auffällig, dass die Hydrocutan Salbe einen Shift der Umwandlungstemperatur bei 70 °C verursacht, während die Vorbehandlung mit der Hydrogalen[®] Salbe die thermischen Umwandlungen der Lipidfraktionen nicht beeinflusst. Beide Formulierungen unterscheiden sich nur in ihrer Emulgatorzusammenstellung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die bei der Hydrocutan Salbe eingesetzten Hilfsstoffe Stearylalkohol, Sorbitansesquioleat und Polysorbat 80 für den Shift verantwortlich gemacht werden können.

4.1.2.3 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluß einzelner Fertigarzneimittel auf humanes Stratum corneum

Das Permeationsverhalten der verschiedenen Fertigarzneimittel ergibt bezüglich des Fluxes keine Unterschiede. Im Zuge der Berechnung der Permeationskoeffizienten hingegen wird die Sättigungskonzentration der Suspensionsformulierungen miteinbezogen. So resultieren für die PerSol-Koeffizienten der Fertigarzneimittel unterschiedliche Werte. Da nur 2 Fertigarzneimittel in Placebo-Formulierung zugänglich waren, können nur hierüber Aussagen gemacht werden. Es wird davon ausgegangen, dass jede Formulierung eine eigene Sättigungskonzentration für Hydrocortison besitzt und sich die PerSol-Koeffizienten unterscheiden werden.

Mit den kalorimetrischen Daten lassen sich zusätzlich Aussagen über den Einfluß der Formulierung auf das Stratum corneum machen. So können für beide ratiopharm-Produkte Senkungen in den Umwandlungstemperaturen der Lipidfraktionen detektiert werden. Als möglicher Enhancer, der das Stratum corneum verändern könnte, kommt in beiden Formulierungen Glycerol in Betracht, welches zusätzlich nach Das Gupta (1975) auf Hydrocortison einen stabilisierenden Effekt ausübt. Im Gegensatz zur Hydrocutan Salbe kann die Dermallerg-ratiopharm® Creme 1% auch mehr Hydrocortison lösen, so dass sich der Persol-Koeffizient senkt. Bei einem weiteren Vergleich zwischen Hydrocutan Salbe und Hydrogalen® Salbe kann der Einfluss des Emulgatorgemisches der Hydrocutan Salbe für den Shift der Umwandlungstemperatur bei etwa 70°C verantwortlich gemacht werden.

Hydrogalen® Creme und Hydro Wolff® Creme enthalten, neben weiteren Hilfsstoffen Propylenglykol und verändern zusätzlich noch den Peak bei 70 °C. Hier muss ein weiterer Effekt durch andere Hilfsstoffe vorliegen. Beide haben aber völlig unterschiedliche Zusammensetzungen, so dass eine weitere Interpretation dieser Daten nicht möglich ist.

Insgesamt können über die Permeationen der Fertigarzneimittel keine Unterschiede festgestellt werden, aber die kalorimetrischen Daten der Stratum corneum-Proben lassen die Vermutung zu, dass die einzelnen Formulierungen durchaus die Lipidstrukturen modifizieren können.

4.1.3 Einfluss von Glycerol, Propylenglykol und einer Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat auf die Stratum corneum-Lipide

Die in Kapitel 4.1.2 untersuchten Fertigarzneimittel sind aus unterschiedlichen Hilfsstoffen zusammengesetzt. Bei genauerer Betrachtung fallen Stoffe auf, die nicht den Gruppen hydrophile Phase, lipophile Phase oder Emulgator zugeordnet werden können. Diesen Stoffen, die im Nachfolgenden aufgezählt werden, kommt eine mögliche permeationserhöhende Funktion zu. So ist in den Fertigarzneimitteln Dermallerg-ratiopharm[®] Creme 1%, ratioAllerg[®] Hydrocortisoncreme und Sanatison[®] Mono unter anderem Glycerol enthalten. Die Fertigarzneimittel Hydro Wolff[®], Hydroderm HC Creme, Hydrogalen[®] Creme und Munitren[®] H fettarm enthalten hingegen Propylenglykol. Da Propylenglykol sehr häufig in Kombination mit anderen potentiellen Enhancern eingesetzt wurde, sind viele Fälle bekannt, bei denen es zu einer permeationsfördernden Wirkung durch Propylenglykol gekommen ist (Panchagnula und Ritschel, 1991; Sato et al., 1988; Simonetti et al., 1995; Aungst et al., 1986). Als Gründe dafür werden eine erhöhte Arzneistofflöslichkeit im Vehikel (Lorenzetti, 1979) und auch eine Akkumulation des Arzneistoffes im Stratum corneum (Wang et al., 2004; Davis und Hadgraft, 1991) angegeben. Die Remederm HC Creme Widmer enthält die Kombination Propylenglykol und Isopropylmyristat. Diese Kombination wurde bereits von Sato et al. (1988) eingesetzt und für eine Permeationssteigerung von Nicorandil verantwortlich gemacht.

Im folgenden Kapitel sollen die Wirkungen dieser Hilfsstoffe auf das Stratum corneum strukturanalytisch untersucht werden. Da die Wirkungsweise von Isopropylmyristat bereits in Kapitel 4.1.1 erläutert worden ist, wird in diesem Kapitel auf eine weitere Diskussion verzichtet. Die Ergebnisse für die Vorbehandlungen des Stratum corneum mit Isopropylmyristat sind zur Vollständigkeit aufgeführt. Damit wird ein Vergleich zwischen der Vorbehandlung der Einzelsubstanzen und der der Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat möglich.

4.1.3.1 Thermoanalytische Untersuchungen des vorbehandelten Stratum corneum

Durch die Vorbehandlung des Stratum corneum mit den reinen Hilfsstoffen werden die Umwandlungstemperaturen der beiden detektierbaren Lipidfraktionen zu niedrigeren Werten hin verschoben. Damit kann grundsätzlich eine Interaktion dieser Substanzen mit den Stratum corneum-Lipiden angenommen werden. Das Ausmaß dieser Erniedrigungen ist in

aufsteigender Rangfolge: Glycerol, Propylenglykol, Isopropylmyristat und die Kombination aus Isopropylmyristat und Propylenglykol (Abb. 4.13). Im Falle des Propylenglykols stimmt das mit Cornwell et al. (1996), der einen Shift der Umwandlungstemperaturen und sogar ein Ausbleiben der Umwandlung bei 105 °C nach Vorbehandlung mit Propylenglykol beobachtet hat, überein. Vor allem die Vorbehandlung mit der Kombination aus Isopropylmyristat und Propylenglykol führt zu einem hohen Shift, obwohl die Addition der Einzelwerte einen wesentlich geringeren Wert erwarten lässt. Dieses kann im Sinne eines eigenen Wirkmechanismus dieser Hilfsstoffe im Vergleich zu den Einzelsubstanzen gewertet werden. In dem Thermogramm von Stratum corneum 2, das nur mit der Kombination vorbehandelt wurde, ist eine zusätzliche schwache Umwandlung bei etwa 53 °C detektiert worden. Von Cornwell et al. (1996) wird diese Umwandlung durch kovalent gebundene Lipide an der Außenseite des corneocyte envelope beschrieben. Da diese Umwandlung bei Stratum corneum 1, ebenso wenig wie bei dessen vorbehandelten Proben, nicht detektiert werden konnte, ist dieser Peak im Sinne einer interindividuellen Variation zu bewerten und wird des weiteren nicht ausgewertet.

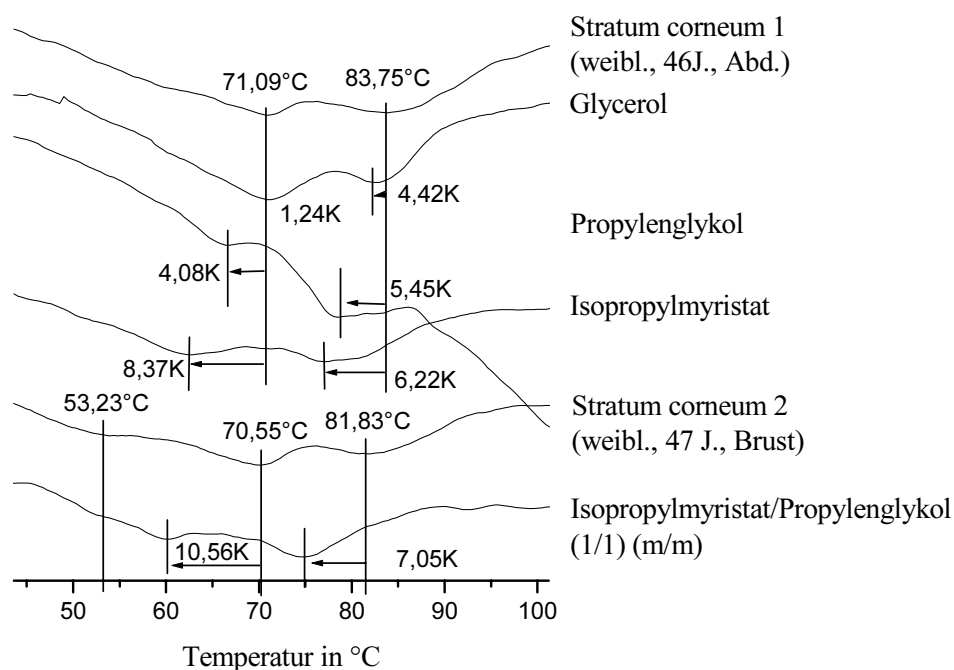


Abbildung 4.13: Thermogramme von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich mit vorbehandelten Proben; Stratum corneum 1 wurde mit Glycerol, Propylenglykol und Isopropylmyristat, Stratum corneum 2 nur mit der Kombination Isopropylmyristat/Propylenglykol vermessen

4.1.3.2 Röntgenmessungen des Stratum corneum, vorbehandelt mit Glycerol, Propylenglykol, Isopropylmyristat und der Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat

a) Röntgenweitwinkeldiffraktometrie

Mit den Röntgenweitwinkeldaten (Tab. 4.7) können im Nahbereich der Stratum corneum-Lipide Veränderungen nachgewiesen werden, die durch den Einfluss der einzelnen Hilfsstoffe entstanden sind.

Nach der Vorbehandlung mit Glycerol wird die Interferenz von ursprünglich 0,373 nm für die orthorhombisch geordneten Lipide auf 0,378 nm vergrößert. Dieses kann mit einer Integration des Glycerols in die Lipidpackung des Stratum corneum und damit Aufweitung der Fraktion

Stratum corneum (weibl., 46 J., Abd.)	0,373+/-0,004	0,413+/-0,003
Glycerol	0,378+/-0,004	0,413+/-0,004
Propylenglykol	0,373+/-0,004	0,418+/-0,004
Isopropylmyristat	0,377+/-0,001	0,409+/-0,004
Isopropylmyristat /Propylenglykol (1/1) (m/m)	0,373+/-0,005	0,420+/-0,004

Tabelle 4.7: Röntgenweitwinkelmessungen von Stratum corneum im Vergleich mit entsprechend vorbehandelten Proben [nm] (Zentrum des Interferenzringes +/- Radius, siehe Kapitel 3.2.3.5)

orthorhombisch geordneter Lipide erklärt werden. Die hexagonal angeordneten Lipide hingegen bleiben unbeeinflusst. Die Vorbehandlung mit Propylenglykol führt zu einer Zunahme der Interferenz hexagonal gepackter Lipide von 0,413 nm auf 0,418 nm. Das unterscheidet sich von den Ergebnissen nach Vorbehandlung mit reinem Isopropylmyristat insofern, als beide Packungen beeinflusst werden. In Einklang mit den Ergebnissen von Kapitel 4.1.1.4 a), wird die Interferenz hexagonal gepackter Lipide durch Isopropylmyristat von 0,413 nm auf 0,409 nm erniedrigt. Orthorhombisch gepackte Lipide erfahren nach der Vorbehandlung mit reinem Isopropylmyristat eine Zunahme der Interferenz von 0,373 nm auf 0,377 nm. Der jeweilige Betrag dieser Änderungen wird zwar als nicht aussagefähig bewertet,

da aber die beiden Lipidfraktionen eine gegenseitige Beeinflussung erfahren, ist dennoch von einer Interaktion mit den Hautlipiden auszugehen. Die Vorbehandlung mit der Kombination aus Isopropylmyristat und Propylenglykol wirkt auf die Stratum corneum-Lipide wie die Behandlung mit reinem Propylenglykol. In diesem Falle ist nur die Interferenz hexagonal geordneter Lipide erhöht, während die der orthorhombisch gepackten Lipide unbeeinflusst bleibt.

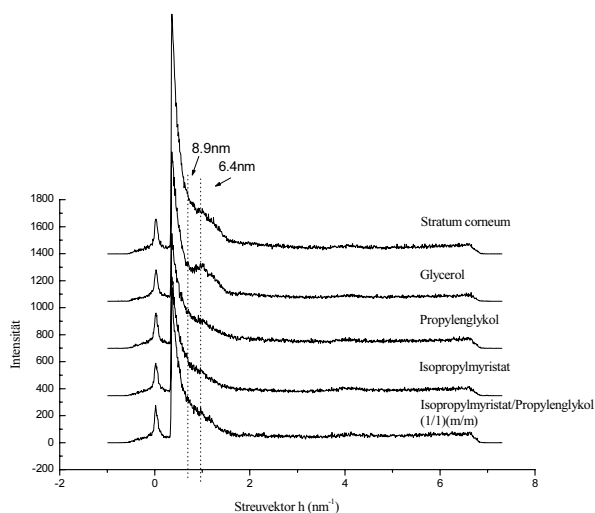
Die dritte schwache Interferenz bei 0,467 nm konnte mit der in dieser Serie getesteten Hautspende nicht detektiert und deshalb nicht ausgewertet werden.

b) Röntgenkleinwinkelmessung

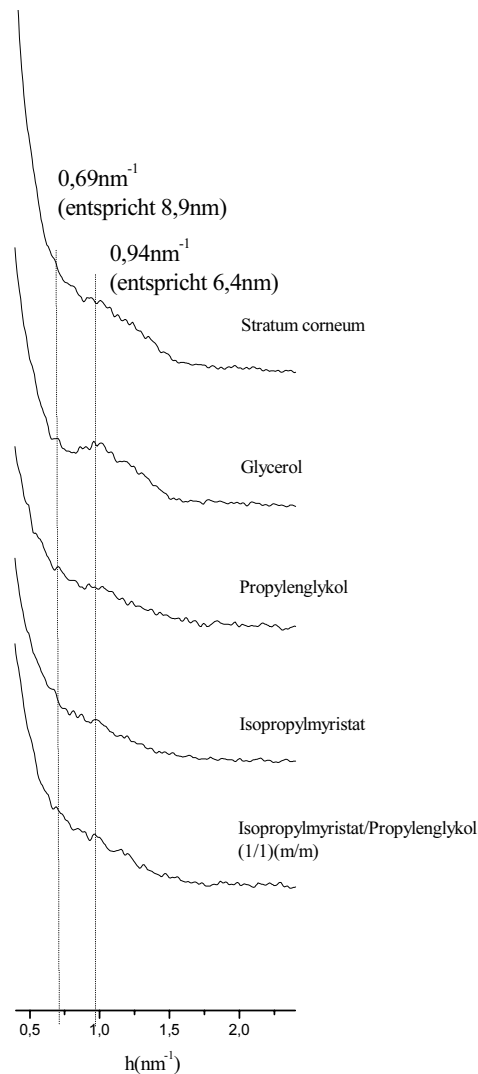
Während mit den Röntgenweitwinkelergebnissen ein lateraler Einbau der Hilfsstoffe in die Stratum corneum-Lipidmatrix nachzuweisen ist, lässt sich mit der Auswertung der Röntgenkleinwinkeldaten eine Auswirkung auf die Fernordnung abschätzen.

Im Gegensatz zu einer Studie von Bouwstra (1992b), in der keine Effekte von Propylenglykol in den Röntgenkleinwinkeldaten gemessen werden konnten, wird in Abbildung 4.14 eine schwache Interferenz bei 8,9 nm nach Vorbehandlung mit Glycerol oder Propylenglykol neben der Interferenz von 6,4 nm sichtbar. Die Vorbehandlung mit Isopropylmyristat und der Kombination Isopropylmyristat und Propylenglykol führt hingegen zu dem gleichen Ergebnis wie die Vermessung von unbehandeltem Stratum corneum.

Offensichtlich kommt es durch die Vorbehandlung des Stratum corneum mit Propylenglykol oder Glycerol neben der ursprünglichen Interferenz von 6,4 nm zu einer Ausbildung einer erweiterten Lamellarschicht. Demnach kann auch nach Auswertung der Röntgendaten von unterschiedlichen Wirkmechanismen der Substanzen auf die Stratum corneum-Lipidmatrix ausgegangen werden.



a)



b)

Abbildung 4.14: Röntgenkleinwinkelmessungen von Stratum corneum (weibl., 46 J., Abd.) unbehandelt und vorbehandelt; a) Original-Daten; b) vergrößerter Ausschnitt nach mathematischer Glättung

4.1.3.3 Zusammenfassende Diskussion über die Wirkung von Glycerol, Propylenglykol, Isopropylmyristat sowie der Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat und der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Fertigarzneimittel-Daten

Mithilfe der kalorimetrischen und röntgenometrischen Daten kann auf eine Integration von Propylenglykol in die hexagonal orientierten Lipide geschlossen werden, während Glycerol in die orthorhombisch gepackten Lipide inkorporiert wird. Diese Ergebnisse stehen im

Gegensatz zu Pilgram et al. (2000). Demnach soll Propylenglykol nur in geringerem Ausmaß hexagonal geordnete und im überwiegenden Teil orthorhombisch strukturierte Lipide beeinflussen. Ein Grund für die unterschiedliche Integration von Propylenglykol und Glycerol, die sich in einer Hydroxylgruppe unterscheiden, sind die sich daraus ergebenden Variabilitäten in Hydrophobizität und Stereochemie. Im Falle der Insertion von Glycerol in die orthorhombische Fraktion kann zusätzlich eine Verdrängung von Wasser in Erwägung gezogen werden. Da der Wassergehalt im Stratum corneum nicht exakt vermessen werden kann, bleibt dieses allerdings lediglich eine Hypothese für weitere Studien.

Die Insertion von Glycerol oder Propylenglykol verursacht eine weitere Interferenz bei 8,9nm. Eine derartig gequollene Schichtstruktur könnte mit einer Integration hydrophiler Moleküle zwischen die hydrophilen Kopfgruppen der Doppelschicht erklärt werden. Die Moleküle können dabei in der Lamellarphase sowohl senkrecht als auch waagrecht zu den Längsachsen der Lipidmoleküle orientiert sein. Diese Interpretation ist jedoch nicht völlig übereinstimmend mit der Literatur, in der ausschließlich von einem lateralen Propylenglykol-Einbau ausgegangen wird (Bouwstra et al., 1991b; Bouwstra et al., 1996). In der Röntgenkleinwinkelbeugung wird eine durch die Vorbehandlung mit Propylenglykol unveränderte Interferenz nachgewiesen und damit eine laterale Insertion zwischen den Lipidkopfgruppen angenommen. Außerdem soll Propylenglykol neben einem Aufweichen der Keratin-Strukturen zu einer Anlagerung an die Lipidkopfgruppen neigen, dort Wasser verdrängen und so die Lamellarschichten fluidisieren (Ward und Tallon, 1988; Lippold und Hackemüller, 1990; Wang et al., 2004). Mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.3 kann allerdings eine Anreicherung von Glycerol oder Propylenglykol in die hydrophilen Bereiche der Stratum corneum Doppelschicht genauso wie eine Integration in lateraler Richtung zwischen den Lipidkopfgruppen der Lamellarstruktur angenommen werden (siehe Abb. 4.15 b) für Glycerol und c) für Propylenglykol).

Der Einfluss von Isopropylmyristat auf humanes Stratum corneum (Abb. 4.15 d) ist in Kapitel 4.1.1.5 bereits diskutiert worden. Da in dieser Teilstudie andere Spenderhaut verwendet wurde, sind auch in diesem Zusammenhang Daten mit reinem Isopropylmyristat aufgenommen worden. Zwar können leichte Variabilitäten festgestellt werden, die Erklärungsansätze sind dennoch auf diesen Spender übertragbar, so dass auf eine neuerliche Interpretation dieser Daten verzichtet wird.

Die Kombination von Isopropylmyristat und Propylenglykol wirkt im Vergleich zu den Einzelsubstanzen mit einem anderen Mechanismus auf die Stratum corneum-Lipide (Abb. 4.15 e). Dieses lassen schon die Shifts der Umwandlungstemperaturen in der Differential

Scanning Calorimetry vermuten. Sie erreichen zwar die höchsten Werte, ergeben aber dennoch nicht die Summe der Werte der Einzelsubstanzen. Röntgenweitwinkeldaten lassen eine Veränderung der hexagonal gepackten Lipide durch die Kombination zu, während die orthorhombischen nicht beeinflusst werden. Dasselbe wurde mit reinem Propylenglykol beobachtet. Die Fernordnung der Lamellarphasen wurde entgegen den entsprechenden Ergebnissen nach der Vorbehandlung mit reinem Propylenglykol nicht beeinflusst. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse auf eine laterale Insertion von Propylenglykol und Isopropylmyristat in die lipophilen Regionen des Stratum corneum schließen, wobei Isopropylmyristat diese Insertion von Propylenglykol zwischen den Lipidkopfgruppen ermöglicht. Damit reagiert die Stratum corneum-Lipidmatrix auf die Kombination aus Isopropylmyristat und Propylenglykol tatsächlich anders als auf die jeweiligen Einzelsubstanzen.

Bei Übertragung dieser Ergebnisse auf die Fertigarzneimittel-Daten aus Kapitel 4.1.2 muß die Konzentrationsabhängigkeit der Lipid-Beeinflussung durch Vorbehandlung mit den Formulierungen berücksichtigt werden. In Abb. 4.5 ist mit den Thermogrammen unterschiedlicher Alkohollösungen ein konzentrationsabhängiger Effekt bewiesen worden. Demzufolge sind die Shifts in den Thermogrammen für die Reinsubstanzen (Abb. 4.13) deutlich höher als in den Thermogrammen der Fertigarzneimittel (Abb. 4.12).

Bei dem Vergleich der beiden ratiopharm-Produkte Dermallerg-ratiopharm® Creme 1% und ratioAllerg® Hydrocortisoncreme werden trotz gleicher Deklaration der Inhaltsstoffe unterschiedlich hohe Shifts in den Thermogrammen detektiert. Dieses kann einerseits mit der Verwendung unterschiedlicher Hautspenden und der damit verbundenen Variabilität aber auch mit unterschiedlichen Konzentrationen an Stratum corneum beeinflussenden Hilfsstoffen in den Rezepturen erklärt werden. Das Fertigarzneimittel Sanatison® mono Salbe enthält auch Glycerol, führt in der Differential Scanning Calorimetry aber nur zu einem Shift der Umwandlungstemperatur bei etwa 83°C. Dieses Ergebnis geht konform mit dem nach Vorbehandlung mit reinem Glycerol. Damit kann davon ausgegangen werden, dass in den ratiopharm-Produkten noch weitere Hilfsstoffe oder Hilfsstoff-Kombinationen auf die Lipidfraktionen des Stratum corneum einwirken.

Die Vorbehandlung des Stratum corneum mit den Fertigarzneimitteln Hydrogalen® Creme und Hydro Wolff® Creme führt zu etwa gleich hohen Shifts beider Umwandlungstemperaturen. Dieses entspricht den Ergebnissen nach Vorbehandlung mit reinem Propylenglykol. Die Vorbehandlung mit der Hydroderm HC Creme und auch mit der Munitren® H Fettarm Creme hingegen beeinflussen nur den Shift der

Umwandlungstemperatur bei 80 °C. Dafür sind mehrere Gründe denkbar: zum einen kann die enthaltene Konzentration an Propylenglykol nicht für eine Beeinflussung der Umwandlungstemperatur bei 70 °C ausreichen. Dieses würde bedeuten, dass auf jeden Fall die Lipidfraktion mit der Umwandlungstemperatur bei 83 °C verändert wird. Zum anderen ist eine Intervention mit anderen Hilfsstoffen, die in den Formulierungen enthalten sind, möglich.

Die Remederm HC Creme Widmer enthält unter anderem die untersuchte Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat. Allerdings sind die Shifts, die nach der Vorbehandlung mit dem Fertigarzneimittel erreicht werden, geringer als diejenigen nach Vorbehandlung mit den Reinsubstanzen. So ist auch hier ein konzentrationsabhängiger Effekt denkbar.

Insgesamt sind die Shifts nach Vorbehandlung mit den Fertigarzneimitteln nicht so hoch wie nach Vorbehandlung mit den Reinsubstanzen bzw. deren Kombination. Da auch die Fluxes der Permeationen alle weitgehend gleich sind, kann auf einen konzentrationsabhängigen Effekt dieser Substanzen geschlossen werden. Dieser Gedankengang setzt voraus, dass die Hilfsstoffe alleine die Stratum corneum-Lipidmatrix beeinflussen und nicht neben oder mit weiteren Hilfsstoffen aus der Formulierung wirken. Ein konzentrationsabhängiger Effekt wird auch durch die Beobachtung der weitgehend gleichen Permeationen unterstützt. Demnach enthalten die Fertigarzneimittel zwar Substanzen, die in der Lage sind, das Stratum corneum zu verändern, aber die Konzentrationen reichen zu einem detektierbaren Effekt in den Permeationen nicht aus. Daneben sollte immer berücksichtigt werden, dass die Sättigungskonzentration von Hydrocortison in den Formulierungen durchaus unterschiedlich sein kann. Allerdings wirkt eine nicht oder kaum modifizierte Lipidmatrix des Stratum corneum als limitierende Barriere und die Permeationen fallen im Endeffekt gleich aus.

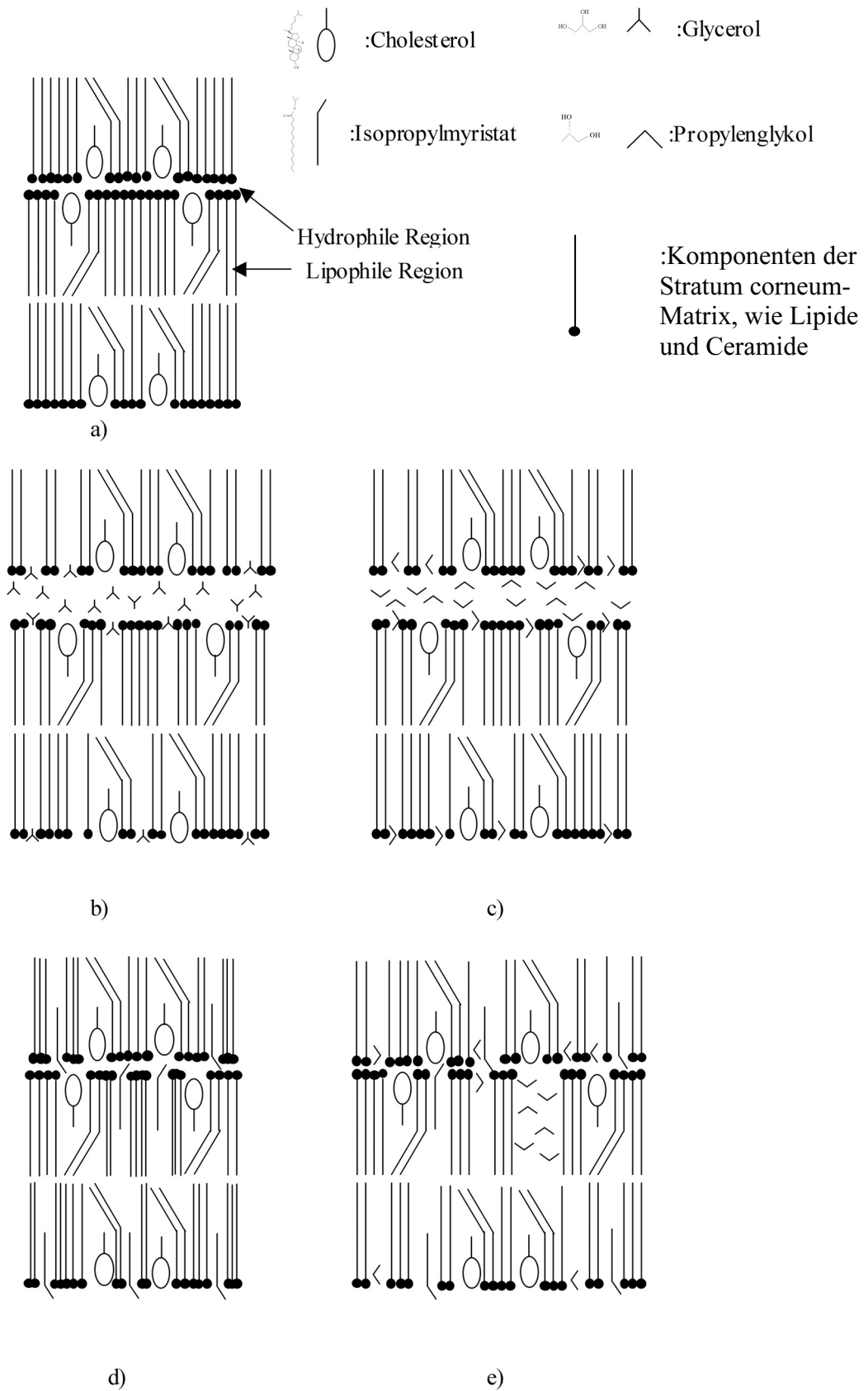


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der Wirkungsmechanismen: a) unbehandeltes Stratum corneum; Vorbehandlung mit b) Glycerol; c) Propylenglykol; d) Isopropylmyristat; e) Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat

4.2 Prednicarbat-Präparate

Das Fertigarzneimittel Dermatop[®] (Aventis, D-Frankfurt) enthält den Wirkstoff Prednicarbat. Dieser Arzneistoff wird in der Haut zu einem aktiven Metaboliten abgebaut und dann weiter in das relativ schwach wirksame Prednisolon umgewandelt. Damit ist sowohl das Soft-Drug- als auch das Prodrug-Prinzip verwirklicht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit ergibt sich die Frage, ob und wie die drei erhältlichen Zubereitungen Salbe, Fettsalbe und Creme sowie deren Variationen Einfluß auf das Stratum corneum nehmen. Vor Bearbeitung dieser Fragestellung muss zunächst geklärt werden, inwieweit Stratum corneum und im Vergleich dazu lebende Hautschichten eines Hautkonstruktes diesen Arzneistoff abbauen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen dann auch Rückschlüsse auf die Barriereigenschaften des Konstruktes.

4.2.1 Metabolisierung von Prednicarbat durch Hautkonstrukte im Vergleich zu excidiertem humanem Stratum corneum

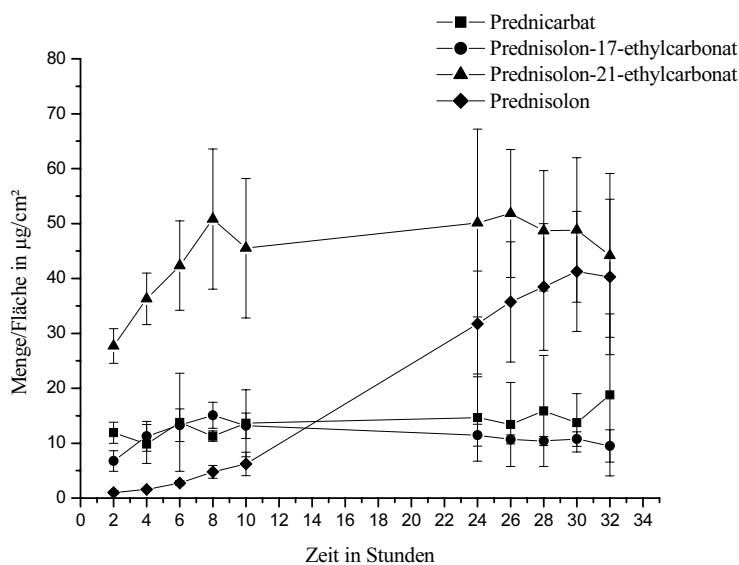


Abbildung 4.16: Vergleich der verschiedenen Derivate des Prednicarbates bei der Permeation durch Hautkonstrukte (Formulierung: Salbe/Basissalbe 1/1 m/m) (n=6)

Der Abbau von Prednicarbat während der Permeation durch das Artificial Skin Construct ist stellvertretend für alle weiteren Permeationskurven in Abb. 4.16 dargestellt. Da sich die Kurven der einzelnen Derivate während der jeweiligen Permeationen gleich zueinander verhalten (siehe Anhang), wird auf die Darstellung weiterer Abbildungen verzichtet.

Die Konzentrationen von Prednicarbat und Prednisolon-(17)-ethylcarbonat bleiben während der Permeation im Akzeptormedium nahezu konstant. Die Kurve für Prednisolon-21-ethylcarbonat steigt erst stark an und erreicht dann eine Plateauphase. Dieses Derivat wird aus dem Prednisolon-17-ethylcarbonat gebildet und reichert sich zu Anfang an. Danach bleibt die Menge konstant, da ein Teil in Prednisolon abgebaut wird, dessen Konzentration bis zum Erreichen eines Endwertes ansteigt. Damit ist ein Abbau von Prednicarbat über Prednisolon-(17)-ethylcarbonat zum Prednisolon-(21)-ethylcarbonat letztendlich hin zum Prednisolon durch das Hautkonstrukt dokumentiert.

Dass dabei Prednicarbat keinen negativen Effekt auf die Vitalität der lebenden Zellen des Hautkonstruktes ausübt, konnte in Zytotoxizitätstests wie dem Neutralrot-Test und MTT-Test nachgewiesen werden. Es trat kein Aktivitätsverlust der Enzyme auf, so dass von einem konstanten Abbau des Arzneistoffes durch die vorhandenen Enzymsysteme ausgegangen werden kann.

In Abb. 4.17 sind die Metabolisierungen der einzelnen Substanzen im Vergleich zwischen Stratum corneum, Hautkonstrukt und dem Blindwert dargestellt. Im Gegensatz zu den Permeationsuntersuchungen wurden bei diesem Versuchsaufbau die Hautkonstrukte in Prednicarbat-angereichertem Medium gehalten und mit diesem angereicherten Medium als Blindlösung verglichen. Für Prednicarbat ist ein sinkender Gehalt in der Blindlösung ermittelt worden. Dieses spricht für einen Abbau durch die Enzyme des Mediums. Die Gehalte nach Metabolisierung durch das Hautkonstrukt und das humane Stratum corneum beginnen nach 2 Stunden bei etwa $1\mu\text{g/ml}$ bzw. $3\mu\text{g/ml}$ Prednicarbat, so dass von einem starken Abbau in der Anfangsphase auszugehen ist. Dieser konnte nicht mit dem Probenahmeschema abgedeckt werden. An der Graphik lässt sich zudem ablesen, dass das Stratum corneum geringere Mengen Prednicarbat als das Hautkonstrukt abbaut. Die Gehalte von Prednisolon-17-ethylcarbonat bestätigen diese Beobachtung. Hier zeigt sich eine Kumulation dieses Abbauproduktes bei der Metabolisierung durch das Hautkonstrukt. Somit wird Prednicarbat schneller abgebaut als die Transformierung der 17-Monoester zum Prednisolon-21-ethylester stattfinden kann. Die Kurve für die Metabolisierung durch das Stratum corneum hingegen ist der des Blindwertes ähnlich. Die Werte für Prednisolon-21-ethylester sind dadurch gekennzeichnet, dass sie für Stratum corneum und Hautkonstrukt zwar gleich tendieren, aber unter denen des Blindwertes liegen. Somit ist von einem weiteren enzymatischen Abbau dieses Metaboliten durch die Enzyme auszugehen. Die Kurven für Prednisolon hingegen liegen um den Blindwert dicht beisammen. Mit dieser Beobachtung wurde eine

Neubewertung der Daten notwendig, die den verschiedenen Voraussetzungen der Metabolisierung durch die unterschiedlichen Gewebe gerecht wird.

In Abb. 4.18 und 4.19 wurden zunächst alle Werte auf das Volumen der jeweiligen Gewebeprobe Stratum corneum beziehungsweise Hautkonstrukt bezogen. Der Blindwert wurde zudem als 100% angesehen und auf ihn alle Metabolisierungswerte bezogen. Im Vergleich der beiden Abbildungen zueinander ist zunächst auffällig, dass die Werte für die verbleibenden Mengen im Stratum corneum höher und unregelmäßiger liegen. Vermutlich kommt es beim Einlegen von Stratum corneum-Proben in dieses Medium zu einer zusätzlichen Enzymtätigkeit neben der des Mediums. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die zusätzlichen Enzyme nicht gleichmäßig im Gewebe verteilt sind bzw. diesem nur anhaften.

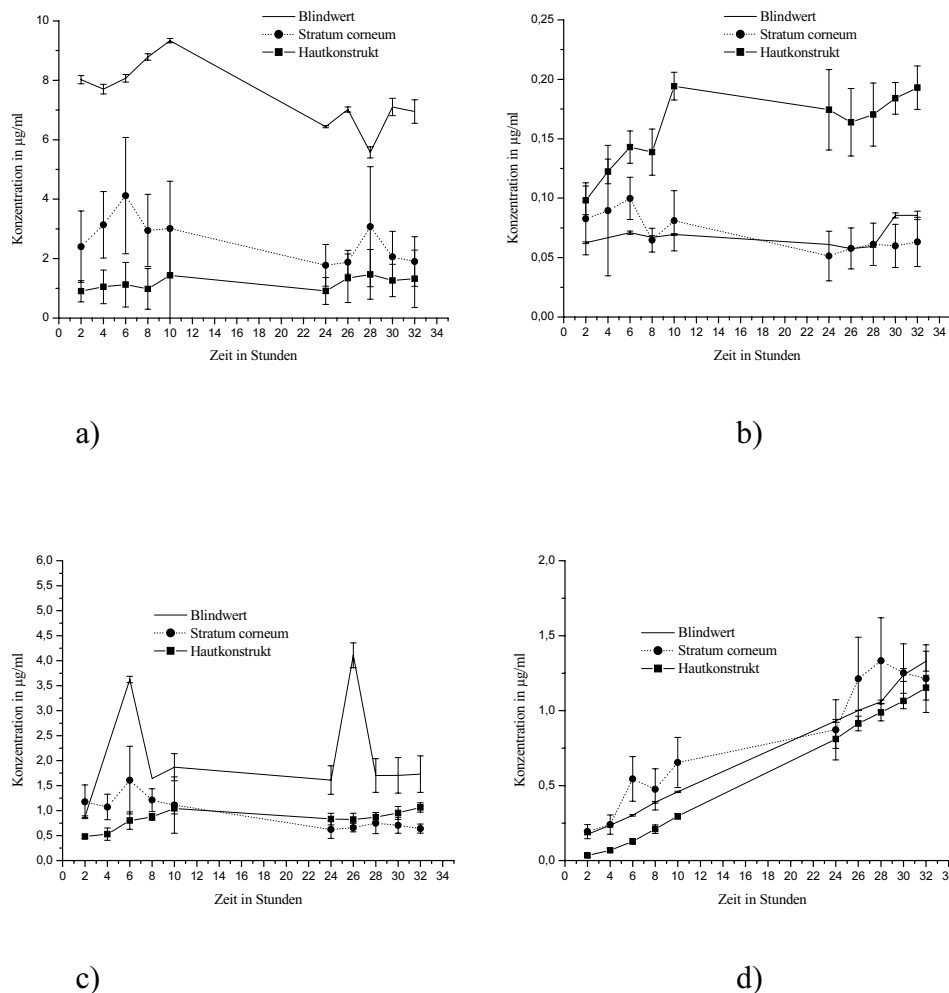


Abbildung 4.17: Konzentrationen während der Metabolisierung durch Stratum corneum (Spender: weibl., 45 J., Abd.) und Hautkonstrukte: a) Prednicarbat; b) Prednisolon-17-ethylcarbonat; c) Prednisolon-21-ethylcarbonat; d) Prednisolon

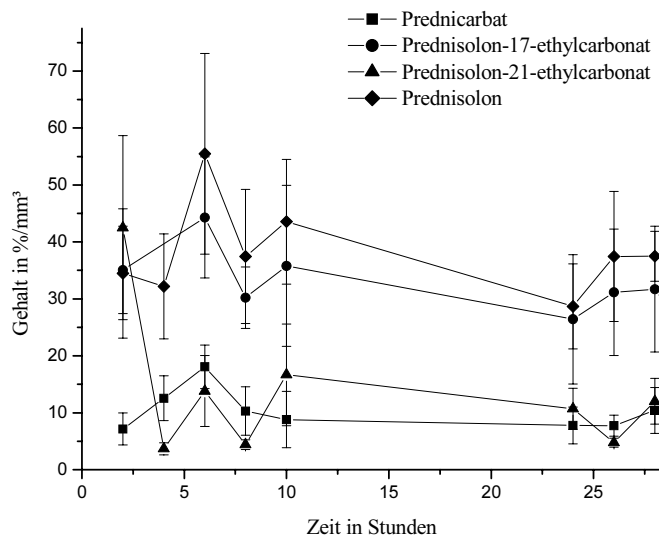


Abbildung 4.18: Verbleibender Prednicarbat-Gehalt nach erfolgter Metabolisierung durch excidiertes humanes Stratum corneum (Spender: weibl., 33 J., Abd.) (n=4-6) (100% entsprechen dem Blindwert)

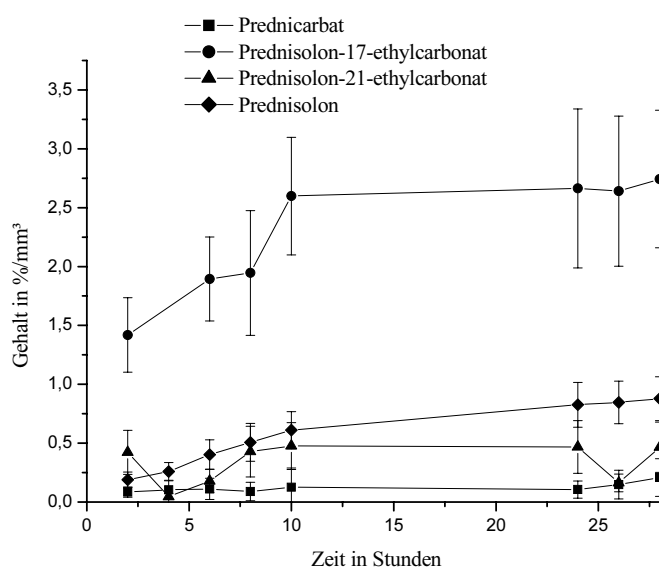


Abbildung 4.19: Verbleibender Prednicarbat-Gehalt nach erfolgter Metabolisierung durch Hautkonstrukte (Spender: weibl., 33 J., Abd.) (n=4-6) (100% entsprechen dem Blindwert)

Die Daten für die Metabolisierung im Hautkonstrukt liegen im Vergleich dazu sehr viel niedriger, so dass auf eine sehr rege Enzymtätigkeit geschlossen werden kann. Das Hautkonstrukt besteht aus lebenden Zellverbänden. Damit kann der Abbau des Prednicarbates

direkt auf diese Zellen zurückgeführt werden. Über den beobachteten Zeitraum steigt die Menge an Prednisolon-17-ethylcarbonat stark an. Dieses kann im Sinne eines eher mäßigen Abbaus des Derivates gedeutet werden. Damit ist auch der stete Anstieg des Prednisolons zu verstehen, das in dieser Metabolisierung Endprodukt ist. Die konstant niedrigen Gehälter des Prednicarbates und des Prednisolon-21-ethylcarbonates lassen auf ihre schnelle Metabolisierung schließen.

Mit diesen Ergebnissen lässt sich klar herausstellen, dass das excidierte humane Stratum corneum zu dem Abbau eines Arzneistoffes keinen Beitrag leistet, während das Artificial Skin Construct aus lebenden Zellverbänden, die eine gesamte Dermis und Epidermis bilden, metabolisch wesentlich aktiver ist. Bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf die Permeationskurven der Dermatop-Zubereitungen ist zwar auch eine Metabolisierung zu beobachten, allerdings sind die Versuchsbedingungen für das Hautkonstrukt anders als in dem Metabolisierungsexperiment. So wird das Konstrukt bei der Permeation zwischen Zubereitung und Puffer geklemmt und liegt nicht im Nährmedium. Daraus ergeben sich vor allem für die äußeren Zellschichten ungünstigere Lebensbedingungen. Nichtsdestotrotz permeiert Prednicarbat durch das Dermisäquivalent und wird dabei in gewissem Maße um- und abgebaut.

Aufgrund des Versuchsaufbaus in der Metabolisierungsstudie wird eine Diffusion des Prednicarbates in das Konstrukt, eine Metabolisierung in den Zellen und eine anschließende Rückdiffusion in das Medium vorausgesetzt. Für die Messung der Konzentrationen im Gewebe wäre eine Extraktion, wie von Gysler, 1998, an Monolayer-Konstrukten durchgeführt wurde, nötig. Darauf wurde allerdings verzichtet, da dieses die Zerstörung der Konstrukte zur Folge gehabt hätte.

4.2.2 Prednicarbat-Permeation durch humanes Hautkonstrukt aus originalen und abgewandelten Dermatop-Produkten sowie Vergleich dieser Permeationen mit denen durch humanes excidiertes Stratum corneum

Neben den wirkstoffhaltigen Dermatop[®] Zubereitungen sind die jeweiligen Basisformulierungen auf dem Markt. Damit ist eine Intervalltherapie möglich und auch eine individuelle Verdünnung der Zubereitungen rezeptierbar. Außerdem ist es möglich, die Dermatop[®] Produkte untereinander zu mischen, um auf individuelle Hautzustände eingehen zu können. Die Frage der Effizienz einer Therapie mit diesen variierten Prednicarbat-Formulierungen ist bisher allerdings nicht erörtert worden.

Der Übersichtlichkeit halber sind die in den folgenden Kapiteln vorgestellten Prednicarbat-Permeationen als Summenkurven dargestellt, die jeweils alle Derivate, über deren Molgewichte berechnet als Prednicarbat, beinhalten.

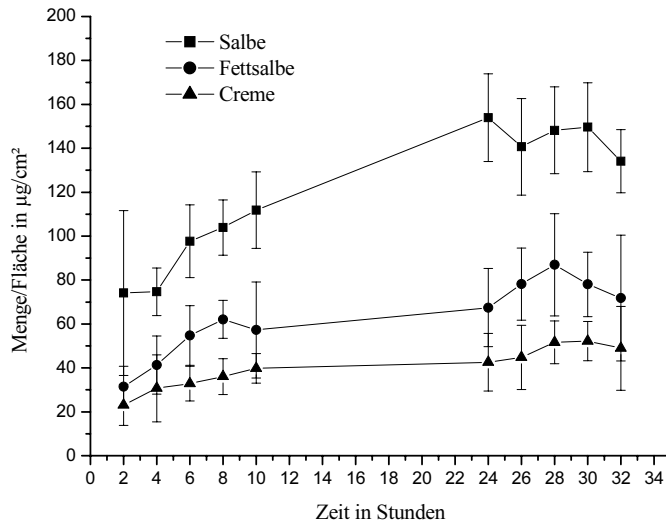
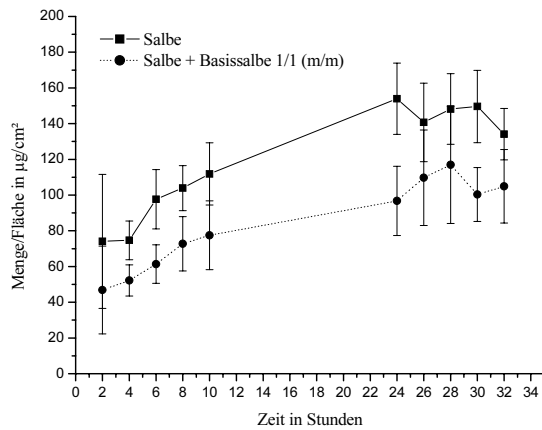


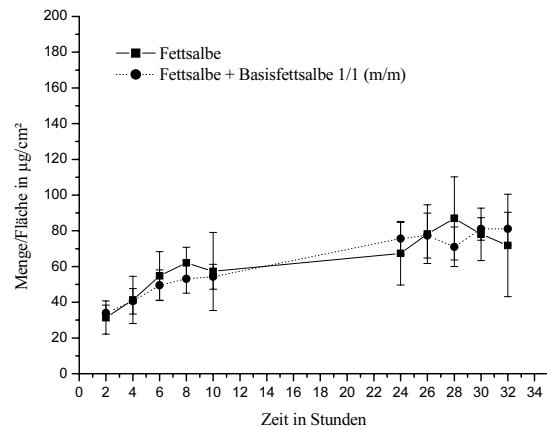
Abbildung 4.20: Vergleich der Permeationen von Prednicarbat aus Dermatotop®-Formulierungen durch Artificial Skin Construct (n=7-10)

Bei dem Vergleich der Permeationen durch Hautkonstrukte aus den verschiedenen Dermatotop® Produkten (Abb. 4.20) ist eine deutlich bessere Permeation aus der Dermatotop® Salbe zu erkennen. Die Permeation aus der Fettsalbe ist nur unwesentlich besser als aus der Creme.

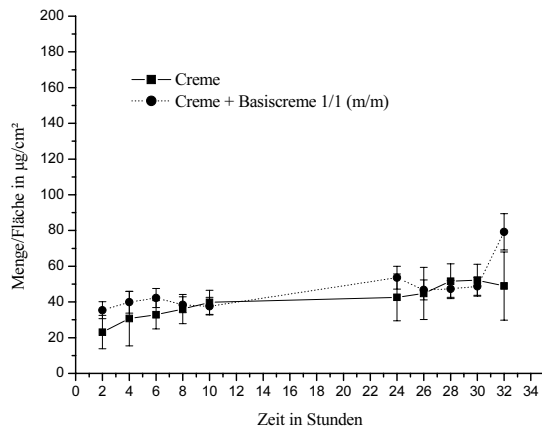
Da alle Dermatotop-Produkte Lösungsformulierungen sind, wird bei einer 1/1 (m/m) Verdünnung mit der jeweiligen Basisformulierung (Abb. 4.21) die aktive Wirkstoffmenge halbiert (von 2,5mg auf 1,25mg je Formulierung). Die Höchstmengen an permeierter Wirkstoffmenge sind allerdings durch die Verdünnung der Formulierungen nicht wie erwartet auf die Hälfte abgesunken, sondern stimmen im Fall der Creme- und Fettsalbe-Verdünnungen mit denen der unverdünnten überein (Abb. 4.21 b und c). Nur aus der verdünnten Salbe permeiert Prednicarbat schlechter als aus der Original-Formulierung.



a)



b)



c)

Abbildung 4.21: Vergleich der Permeationen von Prednicarbat aus originalen und verdünnten Formulierungen durch Artificial Skin Construct : a) Salbe; b) Fettsalbe; c) Creme (n=6-11)

Offensichtlich ist hier die Prednicarbat-Konzentration in der Formulierung geschwindigkeitsbestimmend, während bei der Permeation aus Fettsalbe oder Creme, die Barrierequalität des Stratum corneum geschwindigkeitsbestimmend für die Permeation ist. Im Vergleich der Permeationen mit verdünnten Formulierungen untereinander permeiert auch hier das Prednicarbat aus der Salbe besser als aus der Fettsalbe und der Creme (Abb. 4.22), weil nämlich die Salbenformulierung die Barriere des Stratum corneum schwächt und damit die Permeabilität verbessert.

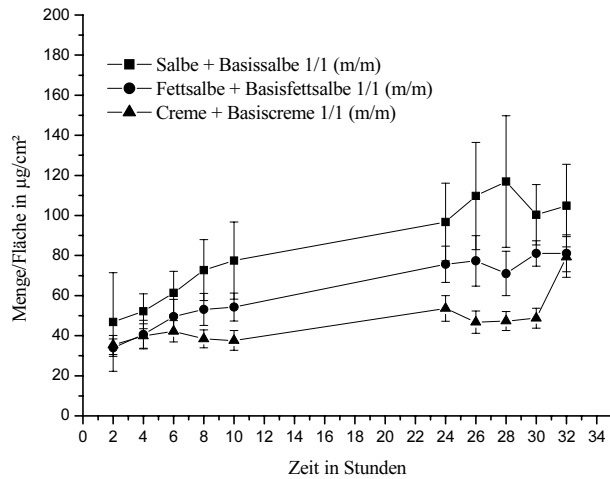


Abbildung 4.22: Vergleich der Permeationen von Prednicarbat durch Artificial Skin Construct aus den verdünnten Formulierungen (n=6-11)

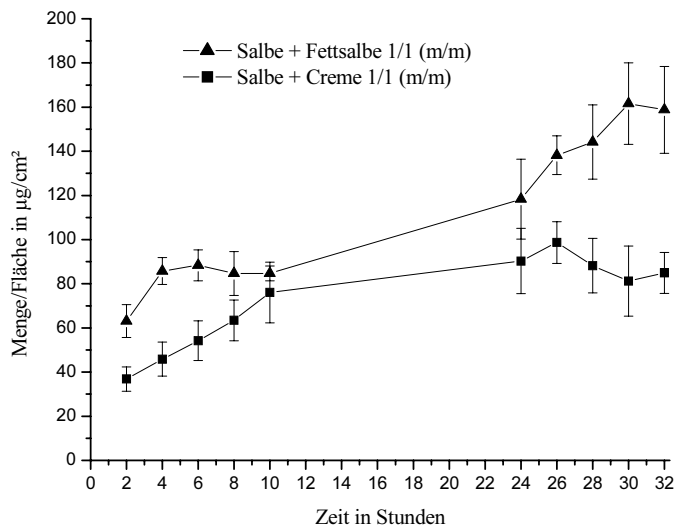


Abbildung 4.23: Vergleich der Permeationen von Prednicarbat durch Artificial Skin Construct aus den Dermatop® Mischungen (n=6-8)

Werden Dermatop® Salbe und Creme bzw. Salbe und Fettsalbe zu gleichen Teilen gemischt, verläuft die Kurve der Mischung aus Salbe und Creme etwas niedriger als die der Mischung aus Salbe und Fettsalbe (Abb. 4.23).

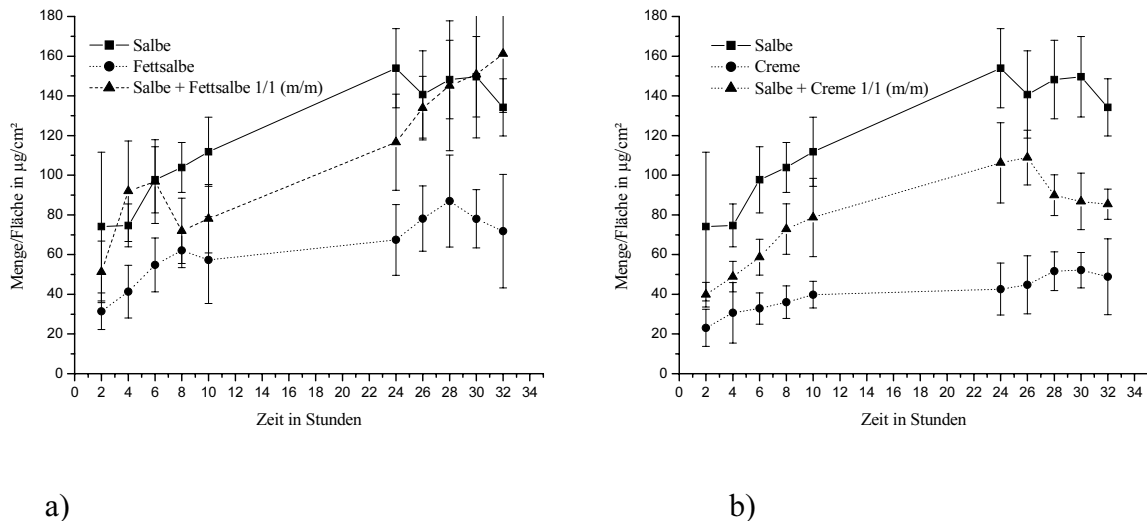
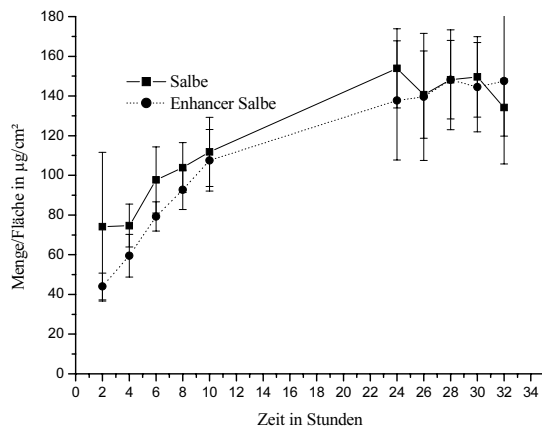


Abbildung 4.24: Vergleich der Permeationen von Prednicarbat durch Artificial Skin Construct aus den Dermatop® Mischungen; a) Salbe, Fettsalbe und deren Mischung; b) Salbe, Creme und deren Mischung

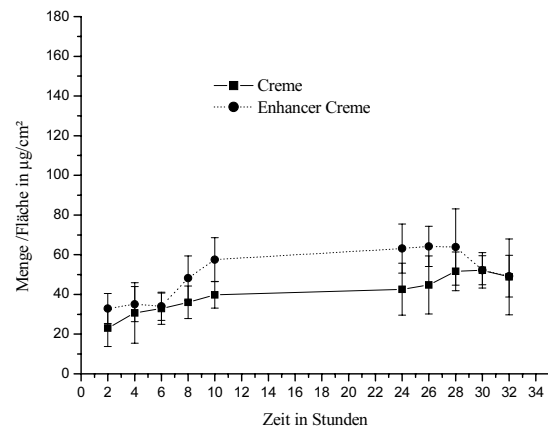
Die Salbe unterscheidet sich von der Fettsalbe qualitativ durch einen Wasseranteil. Bei einer Mischung dieser beiden Grundlagen liegt demnach die Hälfte des Wasseranteils der Salbe (11% m/m) vor. Dieses führt offensichtlich zu einer Permeationsverbesserung. Der gleiche Befund ergibt sich aus Abb. 4.24 b). Allerdings sind für dieses Ergebnis zwei Faktoren zu betrachten. Zum einen enthält die Creme 65,8% Wasser, so dass die Mischung aus Salbe und Creme einen Wasseranteil von 50% besitzt. Zum anderen besteht die Creme aus anderen Hilfsstoffen. Damit können für die bessere Permeation der Dermatop® Salbe sowohl der Wasseranteil als auch zunächst nicht näher erfassbare Inhaltsstoffe in Betracht gezogen werden, die aus dem Vergleich entweder in der Salbe als Permeationsbeschleuniger oder in der Creme als Verzögerer vorliegen.

Bei gleichzeitigem Zusatz von 5% Isopropylmyristat und 10% Isopropylalkohol (siehe Kapitel 4.1) ist graphisch bei allen drei Vehikeln keine Erhöhung der permeierten Arzneistoffmenge erkennbar (Abb. 4.25). Da aber die mit Enhancer versetzten Formulierungen hinsichtlich ihres Wirkstoffgehaltes verdünnt worden sind, kann dennoch von einem permeationsfördernden Effekt durch den Zusatz dieser Stoffe ausgegangen werden. Diese Erhöhung fällt allerdings nicht so eindrucksvoll aus wie bei der Permeation von Hydrocortison durch humanes excidiertes Stratum corneum (Abb. 4.2). Der Grund ist in der schwächeren Ausbildung des Stratum corneum des Hautkonstruktes zu suchen. So wird zwar auch das Stratum corneum des Hautkonstruktes durch die Hilfsstoffe verändert, aber aufgrund

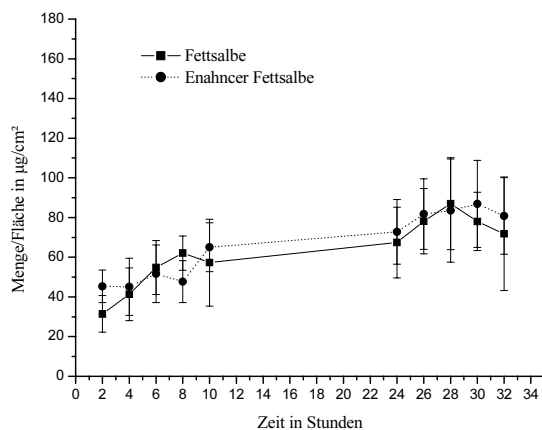
seiner geringeren Dicke fällt das Ausmaß der Permeationserhöhung im Vergleich zu der unveränderten Formulierung geringer aus als bei excidiertem humanem Stratum corneum. Durch den Zusatz an permeationsfördernden Stoffen ist jedoch die Rangfolge der Permeationskurven, Salbe gefolgt von Fettsalbe und Creme, nicht beeinflusst worden (Abb.4.26).



a)



b)



c)

Abbildung 4.25: Vergleich der Permeationen von Prednicarbat durch Artificial Skin Construct aus den Formulierungen, die mit 5 % Isopropylmyristat und 10 % Isopropylalkohol versetzt worden waren (n=9-12)

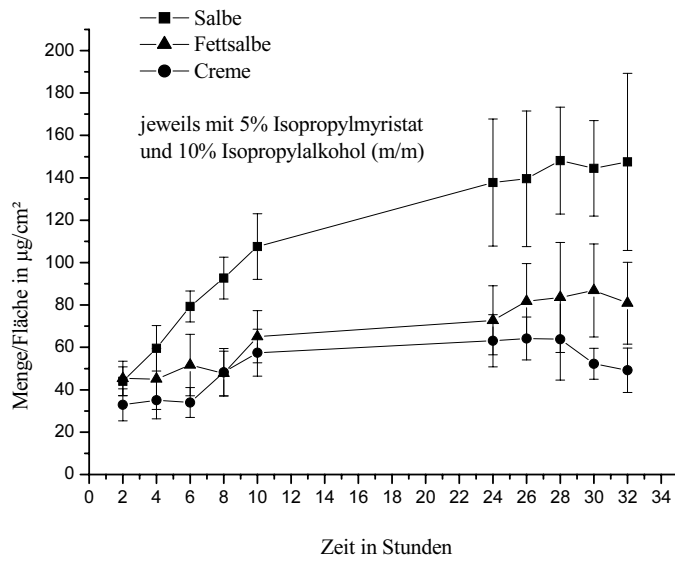


Abbildung 4.26: Vergleich der Permeationen von Prednicarbat durch Artificial Skin Construct aus den Dermatop[®] Mischungen (n=6-8)

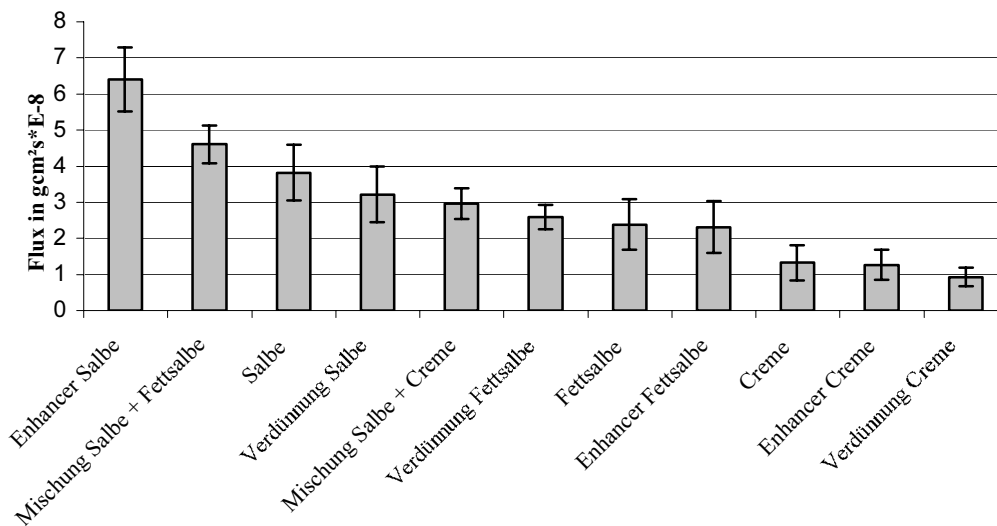


Abbildung 4.27: Flux-Daten, sortiert nach Größe (Enhancer: Zusatz von 10 % Isopropylalkohol und 5 % Isopropylmyristat) (Mittelwert \pm Standardabweichung)

In Abbildung 4.27 sind die Flux-Daten nach Größe sortiert aufgeführt. Der Flux berechnet sich über die Steigung der Permeationsgeraden. Er macht eine Aussage über den durchschnittlichen Mengenzuwachs an permeiertem Arzneistoff pro Zeit und Fläche.

Eine Varianzanalyse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 lässt den Schluss zu, dass die Creme-Formulierungen auf der einen Seite sowie die Formulierungen Enhancer Salbe und Mischung aus Salbe und Fettsalbe auf der anderen Seite nicht mit den anderen Formulierungen vergleichbar sind. Am besten permeiert das Prednicarbat demnach aus der Salbe, die mit der Enhancer-Kombination versetzt worden war.

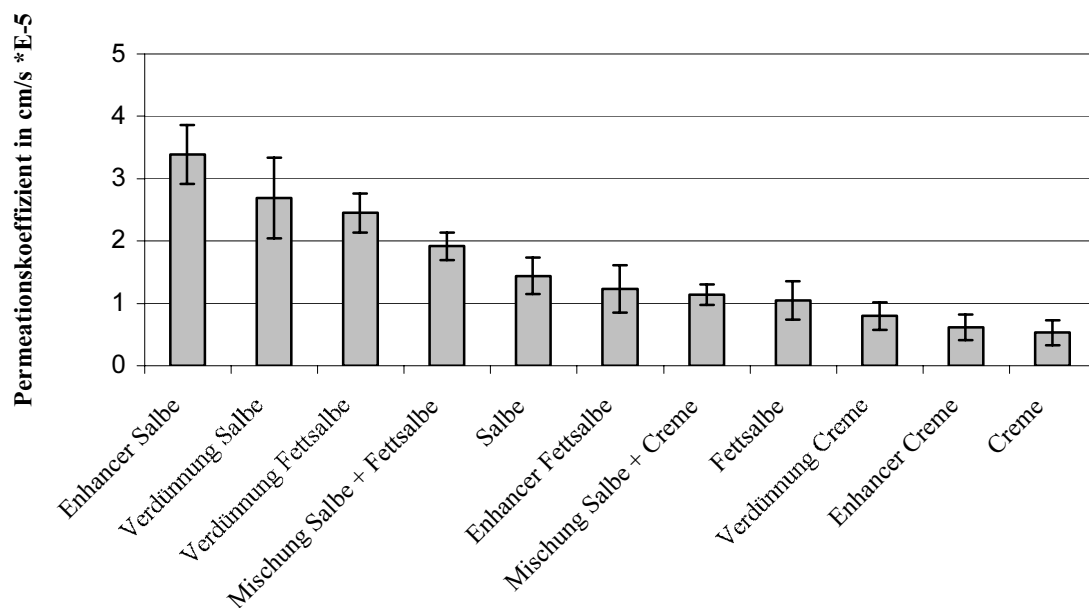


Abbildung 4.28: Permeationskoeffizienten, sortiert nach Größe (Enhancer: Zusatz von 10 % Isopropylalkohol und 5 % Isopropylmyristat) (Mittelwert +/- Standardabweichung)

Mit der Berechnung der Permeationskoeffizienten (Abb. 4.28) geht zusätzlich die reale Arzneistoff-Konzentration in die Interpretation mit ein. Zur Bestimmung der tatsächlichen Prednicarbat-Konzentration in den Formulierungen sind eigene Gehaltsbestimmungen durchgeführt worden. Obwohl von den deklarierten Gehalten abweichend führen die selbst ermittelten Werte zu keinem anderen Ranking der Permeationskoeffizienten als jenes über die Berechnung mit den deklarierten Gehalten.

Mit der 1/1 Verdünnung der Original-Produkte mit ihren Basisformulierungen wird die Konzentration des Prednicarbates halbiert und damit die Permeation im Vergleich der anderen Koeffizienten aufgewertet. Auch die Permeationsdaten von Formulierungen, die mit der

Enhancer-Kombination Isopropylalkohol und Isopropylmyristat versetzt worden waren, erfahren so eine Aufwertung.

Nach Durchführung einer Varianzanalyse können dadurch auf der einen Seite die Formulierungen Enhancer Salbe, Verdünnung Salbe und Verdünnung Fettsalbe und auf der anderen Seite die Creme-Formulierungen nicht zu einer Grundgesamtheit gezählt werden.

4.2.3 Permeation von Prednicarbat durch excidiertes humanes Stratum corneum im Vergleich zu den Hautkonstrukt-Permeationen

Die Permeation von Prednicarbat durch excidiertes humanes Stratum corneum ist im Vergleich zu den Permeationen durch die Hautkonstrukte geringer. Nach 32 Stunden Versuchsdauer, wie in den Permeationsstudien durch Hautkonstrukte, waren keine Prednicarbat-Mengen nachweisbar. Aus diesem Grund erbrachte die Permeation mit dem bisherigen Zeitschema keine auswertbaren Daten.

Um dennoch die Daten von Stratum corneum mit denen von Hautkonstrukt-Permeationen vergleichen zu können, ist der Gehalt im Akzeptor nach 78, 96 und 106 Stunden bestimmt worden. Die Werte sind über diesen Zeitraum stabil (Tab. 4.8). Damit kann davon ausgegangen werden, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Permeationskurve bereits in der Plateauphase befand. Allerdings muss auf einen möglichen Abbau der Stratum corneum-Lipidbarriere hingewiesen werden, der zwar bisher nicht in der Literatur beschrieben worden ist, die Werte aber dennoch kritisch erscheinen lässt.

Grundsätzlich sprechen geringe Mengen an permeiertem Arzneistoff für eine stärkere Barriere des humanen Stratum corneum im Vergleich zu dem des Hautkonstruktes. Dennoch ist eine

	78. Stunde	96. Stunde	106. Stunde
Salbe	18,13 +/- 2,17	18,05 +/- 2,07	19,33 +/- 2,37
Fettsalbe	14,87 +/- 5,47	18,27 +/- 8,40	15,31 +/- 3,86
Creme	10,29 +/- 1,70	13,11 +/- 3,92	12,68 +/- 1,85

Tab. 4.8: Permeationsdaten von Prednicarbat durch excidiertes humanes Stratum corneum (n=5-11) (Spender: weibl., 45 J., Abd.) [permeierte Menge/Fläche in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$] (Mittelwert +/- Standardabweichung)

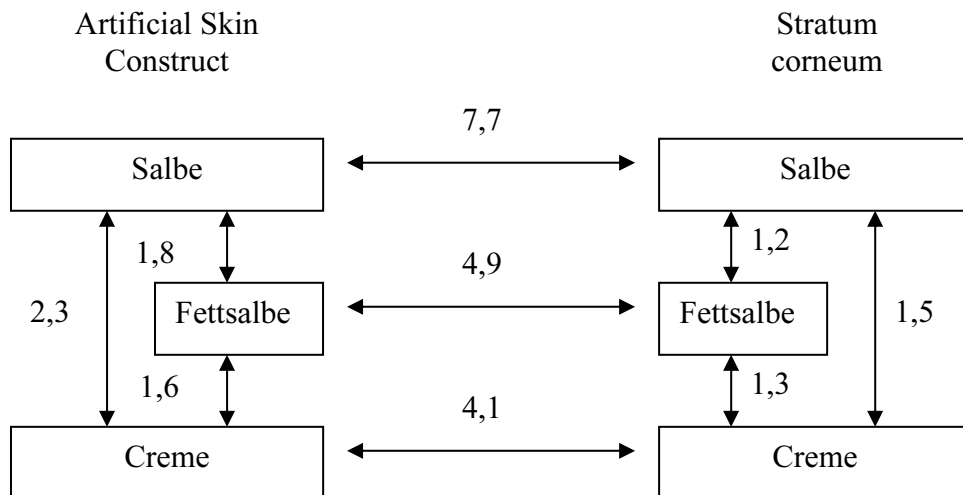


Abbildung 4.29: Verhältnisse der permeierten Prednicarbat-Konzentrationen zueinander in der Plateauphase der Permeation (Artificial Skin Construct (ASC): 26-32h; Stratum corneum (SC): 78-106h)

Rangfolge von Salbe, gefolgt von Fettsalbe und Creme, zu erkennen. Dieses stimmt mit den Ergebnissen der Hautkonstrukt-Permeationen überein und lässt somit die Übertragung der Hautkonstrukt-Permeationen auf die Situation des Stratum corneum zu.

In Abbildung 4.29 sind die Verhältnisse der maximal permeierten Prednicarbat-Mengen zueinander dargestellt. Hierbei wird sowohl ein Vergleich zwischen excidiertem humanem Stratum corneum und Artificial Skin Construct als auch untereinander zwischen den einzelnen Formulierungen möglich. Der Vergleich von excidiertem humanem Stratum corneum mit Hautkonstrukten ist insofern problematisch, als abgestorbene Hautschichten mit einem mehrschichtigen lebenden Dermisäquivalent verglichen werden. Damit beinhalten die Permeationsdaten der Konstrukte nicht nur die Diffusion durch das Stratum corneum, welches verglichen zum Original nur sehr dünn ausgeprägt ist, sondern auch die Passage durch Keratinozytenschichten und Kollagenfasern. Gerade diese Schichten können theoretisch auch von Hilfsstoffen aus dem Vehikel verändert werden. Da aber die Permeation durch diese Zellschichten bzw. deren Beeinflussung durch Hilfsstoffe bisher nicht untersucht worden ist, soll dieser Aspekt zunächst nur als mögliche Erklärung für die Beobachtung dienen, dass die Permeationsdaten der verschiedenen Formulierungen durch die Hautkonstrukte weiter auseinanderliegen als bei dem humanen Stratum corneum.

Prednicarbat permeiert aus der Dermatop[®] Salbe durch das Hautkonstrukt in 7,7fach höherem Ausmaß als durch excidiertes humanes Stratum corneum, während die Faktoren für Fettsalbe

und Creme mit 4,9 und 4,1 nah beieinander liegen. Demnach führt die Salbe sowohl im Vergleich der beiden Barrieren als auch im Vergleich zu Creme und Fettsalbe zu einer verbesserten Permeation. Dieses kann im Sinne einer Permeationsförderung durch entsprechende Hilfsstoffe verstanden werden.

4.2.4 Sättigungskonzentrationen von Prednicarbat in humanem Stratum corneum nach Vorbehandlung mit den untersuchten Formulierungen

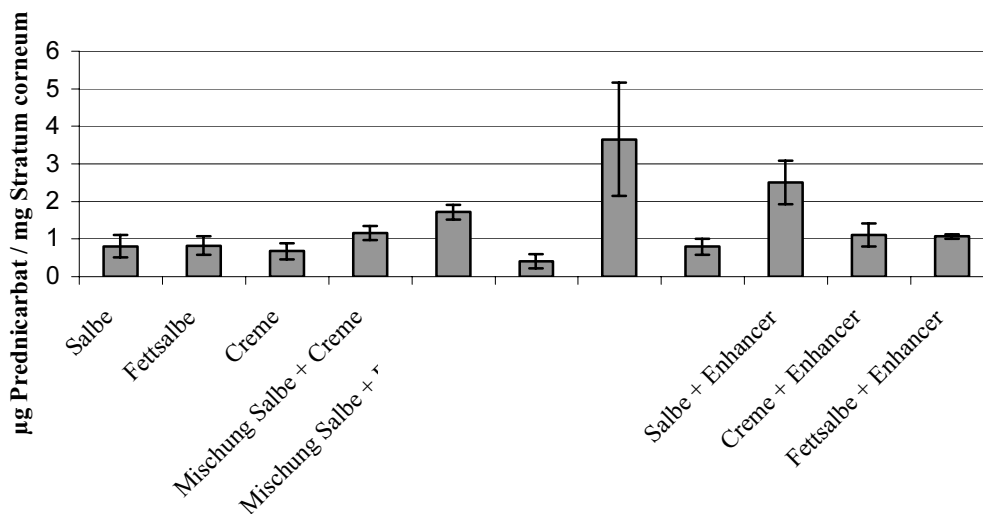


Abbildung 4.30: Vergleich der Sättigungskonzentrationen von Prednicarbat in entsprechend vorbehandeltem Stratum corneum (Spender: weibl., 47 J., Abd.; Enhancer: Zusatz von 10% Isopropylalkohol und 5% Isopropylmyristat) (n=3-6) (Mittelwerte +/- Konfidenzintervalle mit 0,05 Irrtumswahrscheinlichkeit)

Im Gegensatz zu Kap. 4.1 ist auf die Bestimmung der Sättigungskonzentrationen von Dermatop-Produkten verzichtet worden, da nicht genügend Prednicarbat-Feststoff zur Herstellung von unterschiedlich hoch dosierten Formulierungen zur Verfügung stand. Zudem sind alle Produkte Lösungsformulierungen, so dass dieser Parameter zur Interpretation der Permeationsergebnisse keinen Beitrag hätte leisten können. Eine Bestimmung der Sättigungskonzentration der Prednicarbatderivate in den Hautkonstrukten nach den Permeationsversuchen konnte ebenfalls nicht durchgeführt werden, da die Konstrukte sehr fragil sind und nach Einlegen in die Formulierung oder auch nach einem Permeationsexperiment nicht vollständig von den Vehikelresten befreit werden können.

Insofern sind auch die Werte von Abb. 4.30 kritisch zu sehen, weil die vollständige Entfernung von Vehikelresten, in diesem Falle von excidiertem Stratum corneum, schwierig war.

Wie in Abbildung 4.30 ersichtlich, liegen die Stratum corneum Sättigungskonzentrationen von Prednicarbat aus Dermatop[®] Salbe, Fettsalbe, Creme sowie die Verdünnungen und Mischungen innerhalb ihrer Konfidenzintervalle im gleichen Bereich. Lediglich der Wert für die verdünnte Creme hebt sich sowohl durch einen hohen Mittelwert als auch ein hohes Konfidenzintervall heraus. Hier kann davon ausgegangen werden, dass durch eine unzureichende Reinigung der Proben Prednicarbat aus Formulierungsresten mitgemessen worden sind.

Bei der Vorbehandlung mit den Formulierungen, die mit der Enhancer-Kombination aus Isopropylalkohol und Isopropylmyristat versetzt worden waren, kann ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang zu den Permeationsraten gezogen werden. Hier hat die Einwirkung von Dermatop[®] Salbe mit der Enhancer-Kombination eine deutlich höhere Sättigungskonzentration an Prednicarbat zur Folge als bei den anderen beiden Formulierungen. Offensichtlich beeinflussen die Hilfsstoffe der Salbe in Kombination mit den beiden zugesetzten Stoffen die Strukturen des Stratum corneum in der Art und Weise, dass mehr Prednicarbat aufgenommen werden kann.

4.2.5 Thermoanalytische Untersuchungen von Stratum corneum nach Vorbehandlung mit Prednicarbat-haltigen Zubereitungen

Mithilfe der Thermogramme in Abb. 4.31 lassen sich Anhaltspunkte für eine mögliche Veränderung der Stratum corneum-Lipide durch die Dermatop-Vehikel bzw. den Arzneistoff Prednicarbat selbst sammeln. Grundsätzlich ist eine Einflussnahme durch den Arzneistoff möglich und muss ausgeschlossen werden, bevor Hilfsstoffe der Zubereitung für modifizierte Eigenschaften der Stratum corneum-Lipide verantwortlich gemacht werden.

Die detektierten Shifts beider betrachteten Umwandlungstemperaturen des Stratum corneum liegen nach Vorbehandlung mit Prednicarbat- bzw. Prednisolon-Lösung innerhalb der Toleranz von 3 K und sind auf einen besseren Hydratationszustand des Stratum corneum zurückzuführen. Demnach ist der Arzneistoff-Zusatz sowohl bei dem Thermogramm der Salbe als auch bei dem der Creme nicht relevant für die Shifts der Umwandlungstemperaturen. Hier wie auch im Falle des Hydrocortisons in der Dissertation

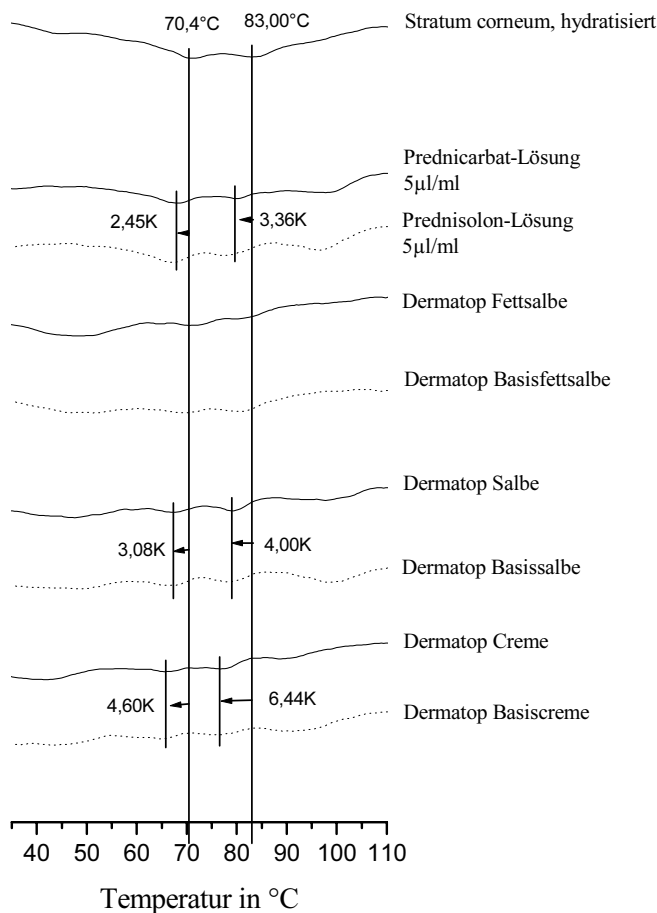


Abbildung 4.31: Thermogramme von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich zu behandeltem (Spender: weibl., 47 J., Abd.)

von Refai (2001) kann von keiner Beeinflussung der Lipidmatrix durch den Arzneistoff ausgegangen werden.

Auch die Fettsalbe modifiziert nicht nennenswert die Lipidmatrix des Stratum corneum. Nur für die Dermatop[®] Salbe und die Creme können Shifts der Umwandlungstemperaturen gemessen werden. Durch die Vorbehandlung mit der Salbe werden die Lipide mit der Umwandlungstemperatur bei 83 °C modifiziert. Dieses deckt sich mit den Permeationserkenntnissen für die Salbe. Die Creme beeinflusst zusätzlich die Lipidfraktion mit der Umwandlungstemperatur bei 70,4 °C. Außerdem verursacht die Vorbehandlung mit der Dermatop[®] Creme den größten Shift, der die an dem cornified envelope gebundenen Lipide betrifft.

4.2.6 Röntgenmessungen von Stratum corneum, vorbehandelt mit Dermatop[®] Zubereitungen

a) Röntgenweitwinkeldiffraktometrie

Die Daten der Röntgenweitwinkelmessungen lassen Aussagen über die Interferenzen im Nahordnungsbereich der orthorhombisch und hexagonal gepackten Lipide zu (Tab. 4.9).

Auffällig ist, dass die Vorbehandlung mit der Salbe eine Aufweitung der Interferenz von 0,372nm auf 0,376 nm und außerdem, in Kombination mit der Creme, die Interferenz von 0,414 nm auf 0,418 nm verursacht. Die Fettsalbe erhöht ebenso beide betrachteten Interferenzen. In Kombination mit der Salbe werden allerdings nur die orthorhombisch gepackten Lipide beeinflusst. Das lässt sich offensichtlich auf die Salbe zurückführen.

Bei Zusatz von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat zu den jeweiligen Dermatop[®] Zubereitungen kommt es zu weiteren Veränderungen im Stratum corneum Interzellularraum. Nach Vorbehandlung mit der entsprechend modifizierten Salbe werden die Interferenzen beider Lipidfraktionen weiter erhöht, vor allem die der hexagonal gepackten Lipide.

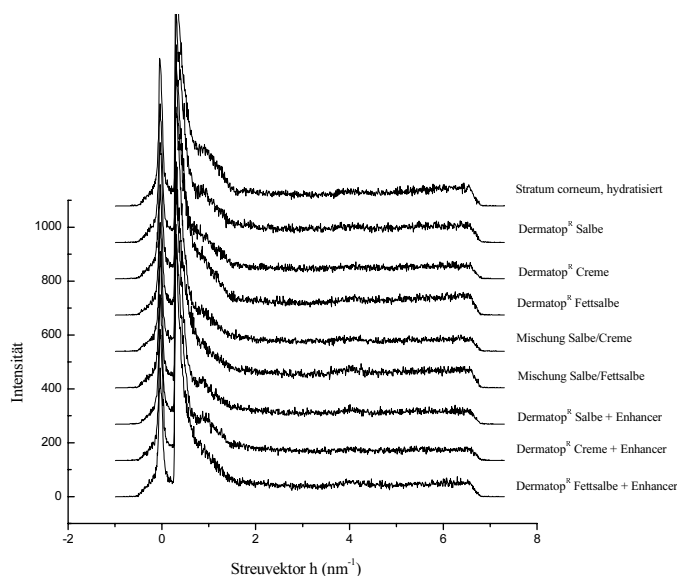
Stratum corneum unbehandelt	0,372	0,414
Salbe	0,376	0,415
Fettsalbe	0,376	0,418
Creme	0,374	0,414
Salbe + Fettsalbe 1/1 (m/m)	0,377	0,412
Salbe + Creme 1/1 (m/m)	0,376	0,417
Salbe + 10 % Isopropylalkohol + 5 % Isopropylmyristat	0,375	0,417
Fettsalbe + 10 % Isopropylalkohol + 5 % Isopropylmyristat	0,372	0,415
Creme + 10 % Isopropylalkohol + 5 % Isopropylmyristat	0,377	0,420

Tabelle 4.9: Röntgenweitwinkelinterferenzen von Stratum corneum unbehandelt und nach Vorbehandlung mit den untersuchten Formulierungen (Spender: weibl., 47 J., Abd.)
[nm]

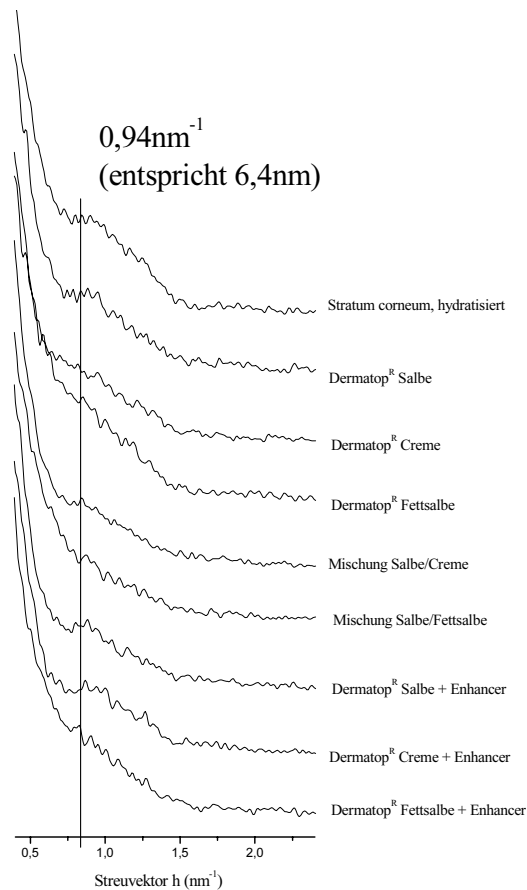
Wird das Stratum corneum mit der Fettsalbe, die zuvor mit der Enhancer-Kombination versetzt worden ist, vorbehandelt, dann werden die Interferenzen für orthorhombisch und hexagonal geordnete Lipide nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem nach Vorbehandlung mit der originalen Fettsalbe und muß auf Interaktionen zwischen den Hilfsstoffen und dem Isopropylmyristat oder dem Isopropylalkohol zurückgeführt werden. Eine Vorbehandlung mit der entsprechend versetzten Creme weitet die Interferenzen für beide Lipidfraktionen noch stärker auf, als es die Original-Creme vermag.

b) Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie

Die Röntgenkleinwinkeldaten für Stratum corneum, das mit den verschiedenen Dermatop[®] Formulierungen vorbehandelt worden ist, lassen nur bedingt Schlüsse auf eine Veränderung im Fernordnungsbereich der Lipidlamellen zu. Aufgrund der geringen Konzentration der beeinflussenden Hilfsstoffe bei der Vorbehandlung mit den Zubereitungen sind keine deutlichen Veränderungen der Stratum corneum Lipidmatrix zu erwarten. Es ist aber dennoch vor allem in Abb. 4.31 b) erkennbar, dass das Signal für die Interferenz der Lamellarphase von 6,4 nm durch die Vorbehandlung von Dermatop[®] Salbe verstärkt wird, während nach Vorbehandlung mit der Fettsalbe oder der Creme die Interferenzen ausbleiben oder zumindest geschwächt werden.



a)



b)

Abbildung 4.31: Röntgenkleinwinkelmessungen von Stratum corneum (weibl., 47 J., Abd.) unbehandelt und vorbehandelt; a) Original-Daten; b) vergrößerter Ausschnitt nach mathematischer Glättung (Enhancer: Zusatz von 10 % Isopropylalkohol und 5 % Isopropylmyristat)

Im Unterschied zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.1 werden die Signale durch die Kombination der Dermatotop[®] Zubereitungen mit der Enhancer-Kombination aus Isopropylmyristat und Isopropylalkohol nicht immer geschwächt. So bleibt die Interferenz von 6,4nm bei Zusatz dieser Enhancer-Kombination zur Dermatotop[®] Salbe und zur Creme erhalten.

4.2.8 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluß Prednicarbat-haltiger Zubereitungen auf Stratum corneum

Der Arzneistoff Prednicarbat ist so konzipiert worden, dass er zur vollständigen Wirkung metabolisiert werden muss und im Verlauf seines weiteren Abbaus das relativ schwach wirksame Prednisolon entsteht. Da sich die Permeationsrate von Prednicarbat durch Stratum corneum in eigenen Voruntersuchungen als sehr gering erwies, wurde auf die Permeation durch Hautkonstrukte ausgewichen, die erwiesenermaßen ein dünneres Stratum corneum und damit eine schwächer ausgebildete Permeationsbarriere besitzen (Specht, 1999; Winkler und Müller-Goymann, 2002b). Eine Studie von Kubota et al. (1993 und 1994) bewies zudem, dass Hautkonstrukte in der Lage sind, Betamethason-17-valerat enzymatisch abzubauen. Dabei findet dieser Abbauschritt nur in den lebenden Teilen des Konstruktes statt. Mit Blick auf einen Vergleich der Permeationen von Hautkonstrukt und excidiertem Stratum corneum stellt sich nun die Frage, inwieweit excidiertes humanes Stratum corneum in der Lage ist, Prednicarbat umzubauen.

Eine Metabolisierung von Prednicarbat wurde im Laufe jeder Permeation durch die Hautkonstrukte beobachtet und steht im Einklang mit den Ergebnissen von Gysler (1998) an Monolayerkulturen von Keratinozyten und Fibroblasten. Um eine mögliche inhibitorische Aktivität des Prednicarbates auf das Hautkonstrukt auszuschließen, wurden zunächst Zytotoxizitätstests durchgeführt. Deren Ergebnisse stehen im Einklang mit jenen von Hein et al. (1988), wonach Prednicarbat erst in sehr hohen Dosen die Kollagensynthese von Fibroblasten inhibiert und die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Dosis keine Beeinträchtigung der Zellfunktionen herbeiführt. Bei dem Vergleich der Metabolisierungsdaten von humanem excidiertem Stratum corneum mit denen vom Artificial Skin Construct fallen vor allem die unterschiedlich hoch abgebauten Mengen der Substanzen auf. Das Stratum corneum führt zudem zu einem sehr unregelmäßigen Abbau des Prednicarbates. Zurückzuführen sein könnte das auf mögliche Enzymrückstände, die noch aus der Isolierung stammen. Nach Schäfer et al. (1982) können im Stratum corneum Enzyme „in einem quasi gefriergetrockneten Zustand“ enthalten sein. Dieser Anteil konnte jedoch bisher in keiner Studie für einen Arzneistoff-Abbau verantwortlich gemacht werden. So fand auch Gysler (1998) über einen Stripping-Test keine metabolische Aktivität im Stratum corneum. Dagegen ist das Hautkonstrukt metabolisch aktiver und baut, entsprechend den Beobachtungen aus den Permeationen, das Prednicarbat ab.

Allerdings sind bei dem Vergleich des Metabolisierungsexperimentes mit der Permeation die unterschiedlichen Umgebungsbedingungen der Zellen zu bedenken. Während die Metabolisierung in mit Prednicarbat angereichertem Nährmedium stattfand, also optimale Lebensbedingungen für die Zellen sichergestellt waren, ist das Hautkonstrukt während einer Permeation zwischen Zubereitung und Puffer als Akzeptormedium eingeklemmt. Zumindest für die Außenflächen des Konstruktes schränken sich damit die Nährbedingungen ein. Andererseits kann bei der Metabolisierung davon ausgegangen werden, dass sich ein Großteil der Substanzen zu jedem Zeitpunkt im Gewebe befindet und durch den Probenzug im Medium nur die bereits wieder herausdiffundierte Menge bestimmt wird. Für die Bestimmung des Arzneistoffes in den Zellen wäre eine vorherige Zellextraktion wie bei Gysler (1998) nötig gewesen, die allerdings die Zerstörung des Konstruktes zur Folge gehabt hätte. Insgesamt sprechen die Werte dieser Versuche für eine deutlich stärkere Metabolisierungsaktivität des Hautkonstruktes im Vergleich zu dem excidiertem Stratum corneum, wobei davon ausgegangen werden muss, dass während des Permeationsexperimentes nicht die volle Vitalität des Hautkonstruktes beibehalten werden kann.

Der Vergleich zwischen den Permeationen mit excidiertem Stratum corneum und Artificial Skin Construct führt vor allem zu der Erkenntnis, dass das humane Stratum corneum eine wesentlich stärker ausgeprägte Barriere darstellt und die permeierten Arzneistoffmengen entsprechend gering ausfallen. Da aber Prednicarbat beide Gewebe aus den unterschiedlichen Vehikeln mit der gleichen Rangfolge permeiert, ist ein Vergleich bzw. eine Übertragung der Hautkonstrukt-Ergebnisse auf das Stratum corneum legitim. Hinzukommt, dass die erhaltenen Permeationsgraphiken der einzelnen Vehikel bei der Permeation durch die Hautkonstrukte weiter auseinanderliegen als die Endwerte durch Stratum corneum.

Im Vergleich der Permeationen der drei kommerziellen Dermatop[®] Zubereitungen zueinander, stellt sich die Dermatop[®] Salbe gefolgt von der Fettsalbe und der Creme als am effektivsten heraus. Auch bei Gysler (1998), schnitt die Fettsalbe in der Permeation besser ab als die Creme, was auf einen okklusiven Effekt der Fettsalbe zurückgeführt wurde. Dieser okklusive Effekt der Fettsalbe ist jedoch im Vergleich mit der Salbe nicht maßgeblich, da in diesem Fall die Fettsalbe zu noch höheren Ergebnissen hätte führen müssen. Die Sättigungskonzentrationen von Prednicarbat im excidiertem Stratum corneum hingegen unterscheiden sich kaum. Die Thermogramme von Stratum corneum, vorbehandelt mit Dermatop[®] Salbe und Creme zeigen eine Senkung beider Umwandlungstemperaturen. Nach Ausschluss einer möglichen Modifizierung der Lipide durch den Arzneistoff Prednicarbat

kann dieses Ergebnis direkt auf die Hilfsstoffe von Salbe und Creme zurückgeführt werden, so dass für diese Effekte einerseits Wasser aber auch andere Hilfsstoffe in Frage kommen. Im Nahordnungsbereich der Lipide weitet die Salbe die Interferenz von 0,372 nm für orthorhombisch gepackte Lipidfraktionen auf, während die Fettsalbe beide betrachteten Interferenzen, also auch die der hexagonal geordneten Lipide, aufweitet. Der Fernordnungsbereich ist dadurch gekennzeichnet, dass er nur bei Vorbehandlung mit der Salbe erhalten bleibt, während die anderen beiden Grundlagen die Fernordnung aufheben. Insgesamt führt zwar auch die Creme zu Umstrukturierungen in der Lipidmatrix der Zellen, aber vor allem die Hilfsstoffe der Salbe, wie auch die der Fettsalbe, führen zur Aufweitung im Nahbereich. Diese ist als mögliche Ursache für die gute Prednicarbat-Permeation aus der Salbe in Betracht zu ziehen.

Eine Verdünnung der Dermatop[®] Formulierungen mit ihren jeweiligen Basisgrundlagen im Verhältnis 1/1 halbiert den Wirkstoffgehalt in der Rezeptur. Da die Dermatop[®] Produkte Lösungsformulierungen sind, wird auch die effektive diffusionsfähige Konzentration an Prednicarbat gesenkt. Dieses führt jedoch nicht zu halbierten Permeationsraten bzw. –mengen aus der Creme und Fettsalbe. Lediglich der Vergleich zwischen Salbe und verdünnter Salbe zeigt graphisch einen geringen Unterschied. In diesem Falle ist die reduzierte Prednicarbat-Konzentration geschwindigkeitsbestimmend für die Permeation gewesen. In diesem Zusammenhang ist eine Modifizierung der Barriereigenschaften des Stratum corneum durch die Hilfsstoffe der Grundlage möglich.

Die Kombination von Salbe mit Fettsalbe bzw. Salbe mit Creme führt in dem einen Fall zur Halbierung des Wassergehaltes der Salbe und in dem anderen Fall zu einem weiteren Zusatz an Wasser und anderen Hilfsstoffen der Creme. In beiden Fällen liegen die Permeationskurven zwischen denen der Original-Formulierungen, so dass sowohl ein Hydratisierungseffekt als auch ein modifizierender Effekt durch die Hilfsstoffe angenommen werden muss. Insgesamt liegt der Permeationskoeffizient für die Mischung aus Salbe und Creme niedriger als der für die Mischung aus Salbe und Fettsalbe. Auch die Sättigungskonzentration von Prednicarbat im Stratum corneum ist nach Vorbehandlung mit der Mischung aus Salbe und Fettsalbe höher und steht damit im Einklang mit den Permeationsergebnissen. Im Falle der Mischung aus Salbe und Fettsalbe korreliert dieses Ergebnis zudem mit den Röntgenweitwinkeldaten, in denen eine Aufweitung der Interferenz für orthorhombisch gepackte Lipide, wie auch im Falle der Vorbehandlung mit der Salbe, erfolgt. Bei der Vorbehandlung mit der Mischung Salbe/Creme hingegen werden beide Interferenzen aufgeweitet. Da dieses Ergebnis nicht auf die Einzelvehikel zurückgeführt

werden kann, ist hieraus ein eigener Mechanismus der beiden Vehikel auf die Stratum corneum-Lipidmatrix zu vermuten.

Bei einem Zusatz von 10 % Isopropylalkohol und 5 % Isopropylmyristat zu den jeweiligen Vehikeln ist gerade für die Salbe eine permeationssteigernde Wirkung zu erkennen. Die Rangfolge Salbe - Fettsalbe - Creme bleibt erhalten. Diese Permeationssteigerung fällt jedoch nicht so eindrucksvoll aus, wie in Kapitel 4.1 mit der Permeation von Hydrocortison aus Enhancer enthaltender wasserhaltiger hydrophiler Salbe. Erklärbar wäre dieses Ergebnis mit einem spezifischen Effekt für den jeweiligen Arzneistoff, es könnte aber auch mit dem nicht so stark ausgeprägten Stratum corneum des Hautkonstruktes zusammenhängen. Dieses wird zwar durch die Enhancer-Kombination modifiziert, aber der Effekt auf die Permeation fällt durch die geringere Dicke schwächer aus. Interessanterweise wirken die variierten Grundlagen Salbe und Creme auf den Nahordnungsbereich der Lipide im Stratum corneum in Form einer Aufweitung beider Lipidfraktionen, während die modifizierte Fettsalbe diese Interferenzen nicht verändert. Die Röntgenkleinwinkeldaten offenbaren vor allem nach der Vorbehandlung mit der modifizierten Fettsalbe und der modifizierten Creme ein Verschwinden der Fernordnung, während nach Vorbehandlung mit der modifizierten Salbe die Lamellarstruktur erhalten bleibt. Dieser Befund weicht von den Ergebnissen aus Kapitel 4.1 ab. Dort wird gerade aus der Vorbehandlung mit Isopropylalkohol bzw. der Mischung aus Isopropylalkohol und Isopropylmyristat ein Verschwinden der Lamellarordnung beobachtet. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von Kapitel 4.1 auf die modifizierten Dermatop[®] Grundlagen ist demnach nicht gegeben, da offensichtlich spezifische Interaktionen der Stratum corneum-Lipide mit diesen Zusätzen und den Hilfsstoffen des Fertigarzneimittels bestehen und sich in den entsprechenden Röntgenergebnissen manifestieren.

Insgesamt kann von einem permeationsfördernden Effekt durch die Dermatop[®] Salbengrundlage ausgegangen werden. Die Dermatop[®] Fettsalbe unterscheidet sich quantitativ von der Salbengrundlage durch einen fehlenden Wasseranteil, so ist voraussagbar, dass deren Effekte auf das Stratum corneum deutlich schwächer sind.

4.3 Gehaltsbestimmung von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol in der Dermatop[®] Salbe und deren Einfluß auf excidiertes humanes Stratum corneum

Es hat sich herausgestellt, dass das Prednicarbat aus der Dermatop[®] Salbe im Vergleich zu den anderen Zubereitungen Fettsalbe und Creme am besten permeiert. Um zu beurteilen, welche Hilfsstoffe in dieser Zubereitung für diese Eigenschaft verantwortlich sein könnten, kann zunächst nur die qualitative Deklaration herangezogen werden. In einer Firmenmitteilung (Thoma et al., 1993) werden die Funktionen der einzelnen Hilfsstoffe in den Dermatop[®] Produkten aufgeführt. So dient gereinigtes Wasser als Lösungsmittel und Benzylalkohol in der Creme als dazu benötigtes Konservierungsmittel. Fettalkohole, Vaseline und dünnflüssiges Paraffin werden als Ölkomponenten und Konsistenzgeber eingesetzt. Zur Stabilisierung der emulgierten lipophilen Phase in der wässrigen werden Polysorbat 60 als O/W-Emulgator und Sorbitanmonostearat als W/O-Emulgator gebraucht. In Salbe und Fettsalbe wird außerdem Glycerolmonooleat als W/O-Emulgator, sowie Magnesiumsulfat in der Salbe zur Stabilisierung der Emulsion eingesetzt. Octyldodecanol dient als Penetrations- und Spreitungsförderer. Zur Komplexierung ist Edetinsäure zugesetzt worden.

Da sich die Salbe von der Fettsalbe nur durch den Wassergehalt unterscheidet, die Creme aber eine völlig andere Zusammensetzung hat, wurde der Schwerpunkt auf Hilfsstoffe in der Salbe gesetzt, die nicht in der Creme vorliegen. Mit diesen Informationen fällt neben dem als Penetrationsförderer deklarierten Octyldodecanol auch das Glycerolmonooleat, welches nur in der Dermatop[®] Salbe und Fettsalbe enthalten ist, auf. Glycerolmonooleat als Reinsubstanz war aus Kostengründen nicht zugänglich. Deshalb ist das Ergebnis der Gaschromatographie als Glycerolmonostearat, welches im Gegensatz zur Ölsäure keine Doppelbindung in der Kohlenstoffkette besitzt, berechnet worden. Durch die fehlende Doppelbindung unterscheiden sich die beiden Carbonsäuren in zwei Wasserstoffatomen sowie in der Mobilität des Fettsäurerestes. Für die Gehaltsbestimmungen ist aufgrund der geringfügig höheren Molekularmasse der Stearinsäure ein geringer Fehler zu erwarten. Unter der Annahme, dass sich die Ergebnisse von denen mit Glycerolmonooleat nicht wesentlich unterscheiden werden, sind auch alle weiteren Daten mit Glycerolmonostearat erarbeitet worden. Glycerolmonostearat ist nach europäischem Arzneibuch (EuAB, 2002) ein Gemisch aus hauptsächlich Monostearyl-glycerol mit unterschiedlichen Mengen an Di- und Triacylglycerolen. Es wird in der Regel als W/O-Emulgator eingesetzt.

Octyldodecanol ist ein einwertiger verzweigter Alkohol, der lokal gut verträglich und praktisch ungiftig ist (Fiedler, 1996). Lediglich nach Anwendung einer Salbe wurde eine

Kontakt-Dermatitis beobachtet, die auf diesen Inhaltsstoff zurückgeführt wurde (Tucker, 1983).

Um einen Zusammenhang zwischen diesen Hilfsstoffen und den Effekten der Dermatop[®] Salbe herstellen zu können, sind nach einer Gehaltsanalyse Modellrezepturen erstellt worden, die dann auf ihre Ähnlichkeiten zur Dermatop[®] Salbe hin überprüft worden sind.

4.3.1 Charakterisierung von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol als mögliche permeationsfördernde Hilfsstoffe der Dermatop[®] Salbe

Nach der säulenchromatographischen Auftrennung der Salbe sind die Mengen an Glycerolmonostearat und Octyldodecanol über eine Gaschromatographie bestimmt (Kap.3.2.1.8) worden. In Kombination dieser Ergebnisse mit einer thermogravimetrischen Bestimmung des Wassergehaltes in der Dermatop[®] Salbe ist eine Rezeptur mit Vaseline als Grundlage erstellt worden (Rezeptur A, Tab. 4.10). Um die Auswirkungen des Mengenverhältnisses in der Rezeptur A einschätzen zu können, sind die Rezepturen B und C ergänzt worden. Mit der Rezeptur B sind die Mengen an Wasser und Glycerolmonostearat erhöht worden, während die Octyldodecanol-Menge reduziert wurde. In der Rezeptur C hingegen ist die Menge an Octyldodecanol heraufgesetzt worden. Diese Mengenvariationen gehen auf Kosten des Vaselineanteiles, wobei davon ausgegangen wird, dass Vaseline für das Stratum corneum indifferent ist.

Die Rezeptur GMS, die ausschließlich Glycerolmonostearat in Vaseline entsprechend der Gehaltsbestimmung enthält und die Rezeptur O, bestehend aus Vaseline und Octyldodecanol, sind zudem mitgetestet worden. So können etwaige Einzeleffekte direkt auf den jeweiligen Hilfsstoff zurückgeführt werden.

Lichtmikroskopische Aufnahmen geben Hinweise auf den strukturellen Zustand der Formulierungen. Mit der Polarisationsmikroskopie können zusätzlich noch flüssigkristalline Zustände visualisiert werden. Bei Betrachtung der Mikroskopbilder in Abb. 4.32 ist neben den generellen Unterschieden der Texturen auffällig, dass die Dermatop[®] Salbe im polarisierten Licht zusätzlich Malteserkreuze zeigt. Demnach richten sich die Hilfsstoffe in dieser Grundlage in flüssigkristallinen Strukturen lamellarartig aus. Sowohl die Dermatop[®] Salbe als auch die Basissalbe bilden Malteserkreuze aus. Damit ist bewiesen, dass der Arzneistoff Prednicarbat nicht an der Ausbildung der flüssigkristallinen Bereiche beteiligt ist. Weder Fettsalbe noch die anderen Rezepturen sind in der Lage, im Polarisationslicht Malteserkreuze zu erzeugen. Ansatzweise kann lediglich bei der Rezeptur B ein der

Dermatop[®] Salbe ähnliches mikroskopisches Bild errahnt werden. Es muss aber deutlich hervorgehoben werden, dass die Mikroskopie keine Aussage über das Potential einer Beeinflussung der Stratum corneum-Lipide zulässt.

	A	B	C	GMS	O
Vaseline	70,7	65	68,7	99,7	93
Wasser	22	28	21	/	/
GMS	0,3	6	0,3	0,3	/
Octyldodecanol	7	1	10	/	7

Tabelle 4.10: Rezepturen der Formulierungen in % (m/m)

Die Dermatop[®] Salbe, sowie auch die Rezepturen A bis C sind vom Wasser-in-Öl-Typ. Wird allerdings die Dermatop[®] Salbe mit ihrer Creme gemischt, wie in Kap. 4.3.1 untersucht, dann resultiert daraus ein Öl-in-Wasser-Typ.

4.3.2 Thermoanalytische Untersuchungen von excidiertem humanem Stratum corneum vorbehandelt mit den verschiedenen Modellrezepturen

Die Thermogramme aus Abb. 4.33 geben den Einfluss der einzelnen Rezepturen auf die Lipidmatrix des Stratum corneum wieder.

Die Vorbehandlung mit der Dermatop Salbe führt zu einem Shift der Umwandlungstemperatur für an Proteine gebundenen Lipide bei etwa 80 °C. Auch die Vorbehandlungen mit den Rezepturen B und C verursachen solche Shifts. Die andere Umwandlungstemperatur bei etwa 70 °C wird durch die Vorbehandlung des Stratum corneum mit der Dermatop[®] Salbe nur um etwa 2 K verschoben. Dieses vermag auch die Rezeptur A, während bei Rezeptur C von einer kleinen Erhöhung der Umwandlungstemperatur gesprochen werden kann. Dieses käme, wäre sie größer als die Toleranz von 3 K, einer Strukturerrhöhung gleich. Damit kommt Rezeptur B dem Effekt der Dermatop[®] Salbe auf das Stratum corneum am nächsten.

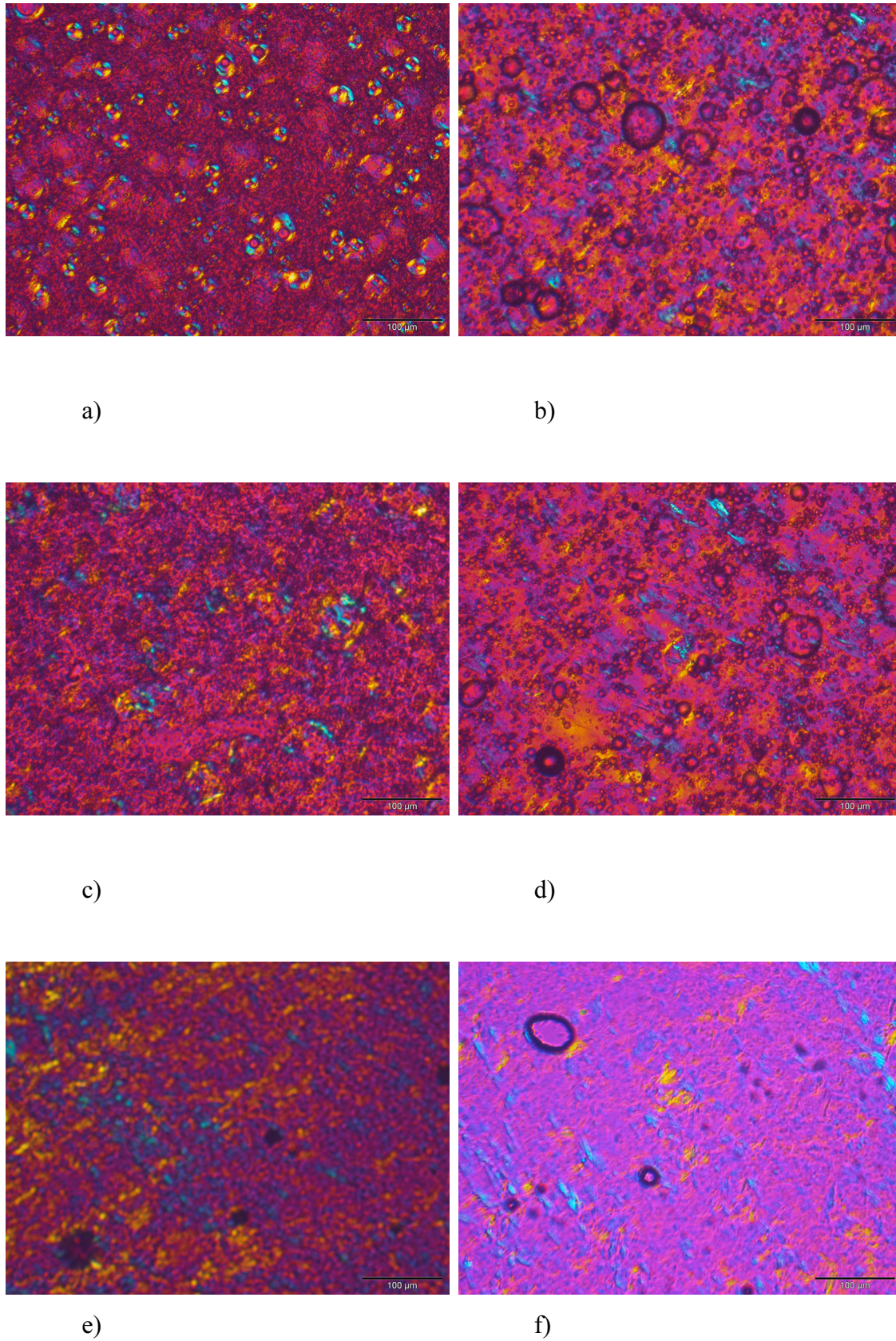


Abbildung 4.32: Polarisationsmikroskopische Bilder der Rezepturen aus Tab. 4.8:
a) Dermatop-Basissalbe; b) Rezeptur A; c) Rezeptur B; d) Rezeptur C; e) Rezeptur GMS; f) Rezeptur O

Die Resultate, die die Vorbehandlung der Rezepturen O und GMS auf das Stratum corneum hervorrufen, können Auskunft über eine mögliche Modifizierung des Stratum corneum durch die Einzelsubstanzen geben. Hier verursacht nur die Rezeptur GMS einen Shift der Umwandlungstemperatur bei etwa 70 °C. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Kombination aus Glycerolmonostearat und Octyldodecanol und nicht die Einzelsubstanzen für die Umstrukturierung der Lipidmatrix und damit der Verschiebungen der Umwandlungstemperaturen verantwortlich sind.

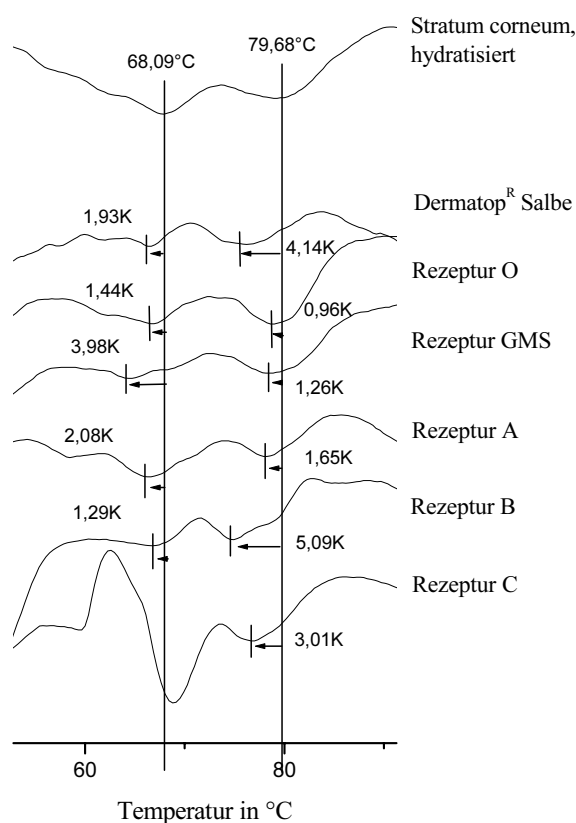


Abbildung 4.33: Thermogramme von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich zu behandeltem (Spender: weibl., 47 J., Abd.)

4.3.3 Röntgenmessungen von excidiertem Stratum corneum nach Vorbehandlung mit den Modellrezepturen

Die Röntgenmessungen nach der Vorbehandlung mit den Modellrezepturen sollten einerseits klären, inwieweit die Stratum corneum–Lipide im Nah- und Fernbereich durch Glycerolmonostearat und Octyldodecanol beeinflusst werden. Andererseits sollte auch hier ein etwaiger synergistischer Effekt der Kombination im Vergleich zu den Einzelsubstanzen

geprüft werden. Da sich die Rezeptur B der Dermatop[®] Salbe am ähnlichsten verhalten hatte, wurde sie den anderen beiden Rezepturen vorgezogen und für die weiteren Messreihen verwendet.

a) Röntgenweitwinkeldiffraktometrie

Stratum corneum, unbehandelt	0,372	0,414
Dermatop [®] Salbe	0,376	0,415
Rezeptur B	0,374	0,413
Rezeptur O	0,373	0,412
Rezeptur GMS	0,373	0,416

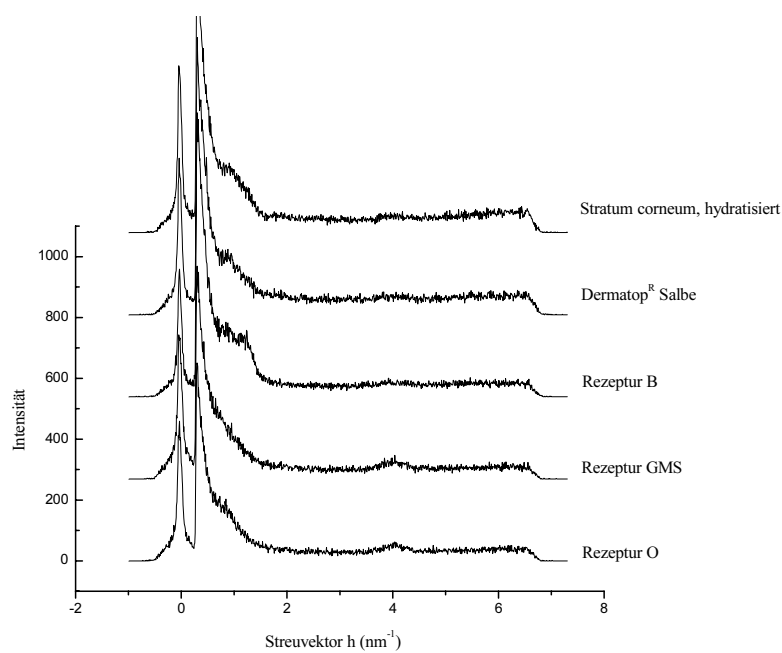
Tabelle 4.11: Röntgenweitwinkelinterferenzen von Stratum corneum unbehandelt und nach Vorbehandlung mit den untersuchten Formulierungen (Spender: weibl., 47 J., Abd.)
[nm]

Mit der Röntgenweitwinkeldiffraktometrie soll der mögliche Einfluss der Hilfsstoffe Glycerolmonostearat und Octyldodecanol auf den Nahbereich der Stratum corneum-Lipide aufgedeckt werden. In Tabelle 4.11 sind die ermittelten Werte für orthorhombisch und hexagonal geordnete Lipide aufgelistet. Die deutlich auf 0,376 nm aufgeweitete Interferenz orthorhombisch angeordneter Lipide nach der Vorbehandlung mit der Dermatop[®] Salbe lässt sich mit keiner der Rezepturen erreichen.

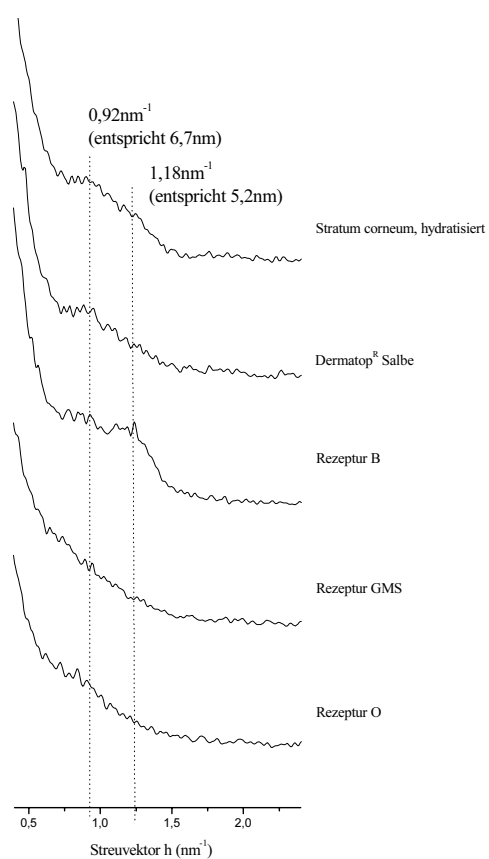
Zu bemerken ist außerdem, dass die Stearinsäure, in diesem Falle stellvertretend für die Ölsäure eingesetzt, keine Doppelbindung in der Molekülstruktur aufweist. Damit kann ein möglicher Effekt der Doppelbindung und damit einhergehender Veränderung des Kristallisationsverhaltens auf die Stratum corneum-Lipidmatrix nicht detektiert werden.

b) Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie

Die Beeinflussung der Fernordnung der Lamellarschichten durch die Vorbehandlung mit den Rezepturen weisen in dieselbe Richtung wie die der Röntgenweitwinkeldaten. Die Interferenz von 6,7 nm des unbehandelten Stratum corneum bleibt durch die Vorbehandlung mit Dermatop[®] Salbe weitgehend erhalten (Abb. 4.34). Nach der Vorbehandlung mit der Rezeptur B ist ein weiteres Signal, das einer Lamellarschicht mit einer Interferenz von 5,2 nm



a)



b)

Abbildung 4.34: Röntgenkleinwinkelmessungen von Stratum corneum (Spender: weibl., 47 J., Abd.) unbehandelt und vorbehandelt; a) Original-Daten; b) vergrößerter Ausschnitt nach mathematischer Glättung

entspricht, detektiert worden. Demnach führt die Kombination von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol zu der Ausbildung einer Struktur, möglicherweise einer Lamellarschicht. Die Vorbehandlungen mit den Rezepturen GMS und O führen zu einem Ausbleiben dieser Interferenz, so dass von einer Auflösung der Lamellarschicht ausgegangen werden kann. Diese Messungen weisen auf einen spezifischen Einfluß dieser Hilfsstoffkombination auf die Stratum corneum-Lipidmatrix hin.

4.3.4 Permeationen von Prednicarbat aus der Rezeptur B im Vergleich zu den Dermatop[®] Zubereitungen

Ein Permeationsvergleich zwischen der Dermatop[®] Salbe und der Rezeptur B dient letztendlich zur Überprüfung, ob gerade die Kombination aus Glycerolmonostearat und Octyldodecanol einen ebenso günstigen Effekt hat wie die Dermatop[®] Salbe. Eine Vergleichbarkeit der Permeationen von Dermatop[®] Salbe und der Rezeptur B würde somit die Richtigkeit der Rezepturzusammenstellung B unterstützen.

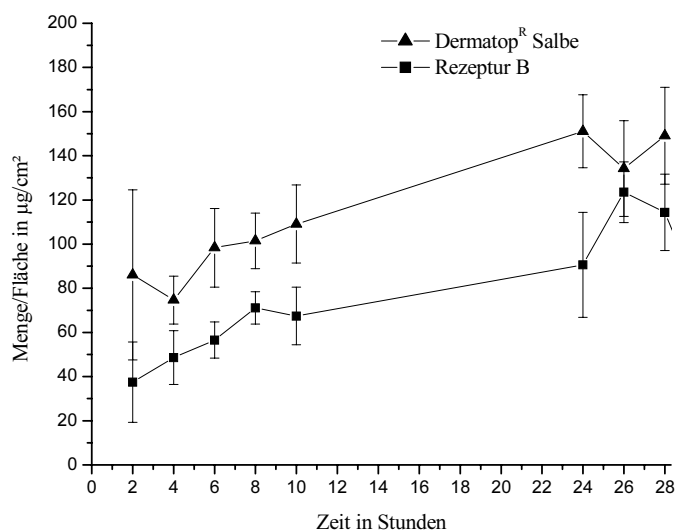


Abbildung 4.35: Permeationen von Prednicarbat durch Artificial Skin Construct aus Rezeptur B (2,47 mg Prednicarbat/g Formulierung) sowie Dermatop[®] Salbe (2,5 mg Prednicarbat/g Formulierung) (n=6-8)

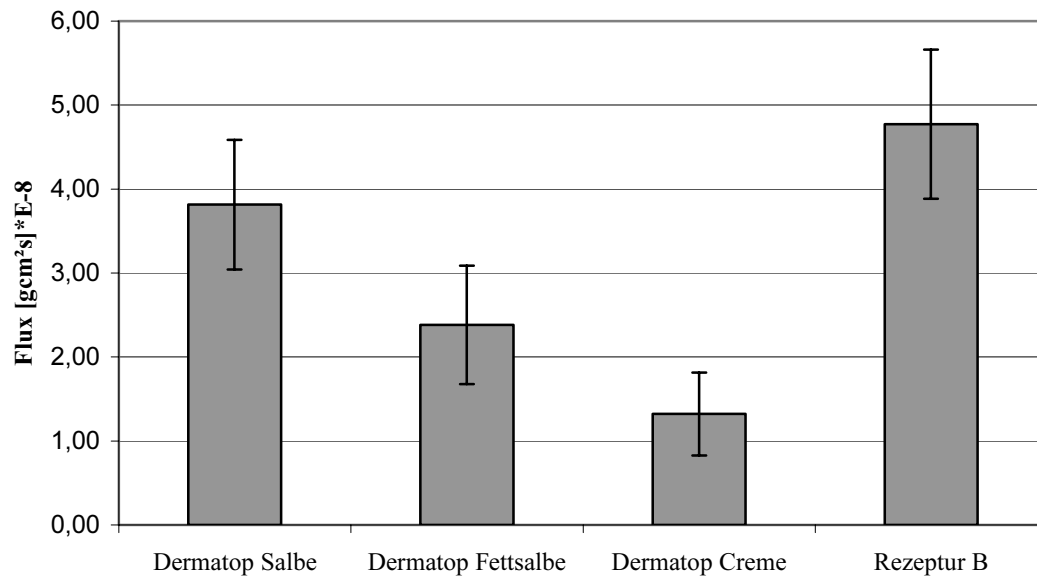


Abbildung 4.36: Fluxdaten der Permeationen von Prednicarbat aus Dermatop[®] Salbe, Creme und Fettsalbe im Vergleich mit Rezeptur B (Mittelwert +/- Standardabweichung)

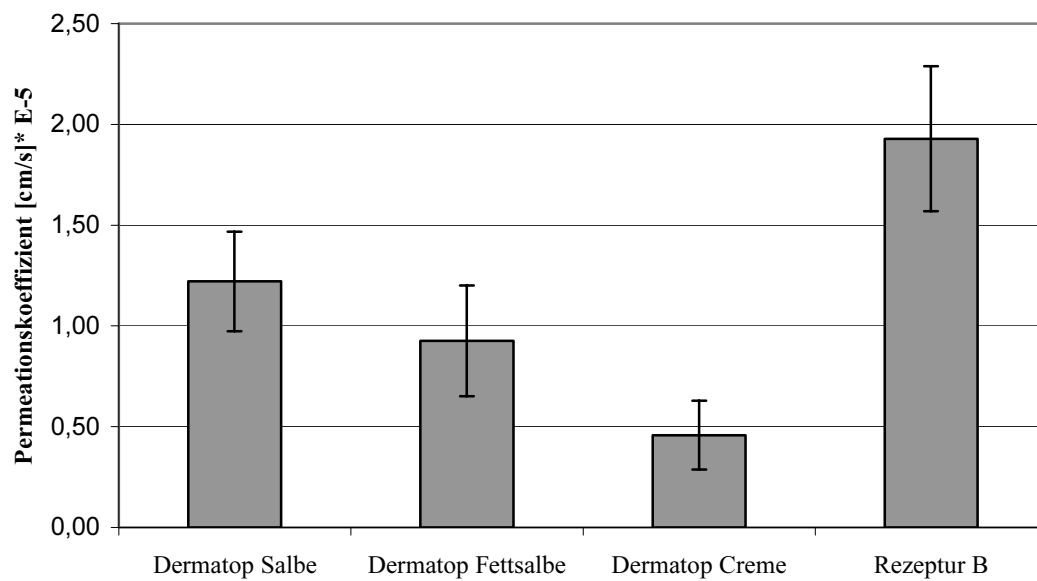


Abbildung 4.37: Permeationskoeffizienten der Permeationen von Prednicarbat aus Dermatop[®] Salbe, Creme und Fettsalbe im Vergleich mit Rezeptur B (Mittelwert +/- Standardabweichung)

Die Permeationskurve von Rezeptur B verläuft etwas unterhalb der der Dermatop[®] Salbe (Abb. 4.35). Die Fluxdaten der Permeationen von Prednicarbat aus Dermatop[®] Salbe, Creme und Fettsalbe verglichen mit denen aus Rezeptur B sind in Abb. 4.36 dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Steigung der Permeation aus Rezeptur B steiler ist. Da in dieser Modellrezeptur etwas weniger Prednicarbat enthalten war, als in den Original-Zubereitungen, setzt sich der Permeationskoeffizient noch deutlicher von den anderen Werten ab (Abb. 4.37). Damit kann die Rezeptur B als mindestens genauso effektiv, wenn nicht sogar besser, als die Dermatop[®] Salbe eingestuft werden.

4.3.5 Zusammenfassende Diskussion über den Einfluss von Octyldodecanol und Glycerolmonostearat auf excidiertes humanes Stratum corneum

Über die Rekonstruktion der Rezeptur der Dermatop[®] Salbe sollte versucht werden, mögliche permeationsfördernde Inhaltsstoffe dieser Grundlage und ihre Wirkung auf die Stratum corneum-Lipidmatrix zu charakterisieren. Als permeationsfördernde Hilfsstoffe in der Dermatop[®] Salbe kommen Octyldodecanol und Glycerolmonooleat in Frage. Die nach einer gaschromatographischen Analyse erhaltenen Gehaltsangaben dieser Substanzen (Glycerolmonooleat musste in diesem Falle durch Glycerolmonostearat ersetzt werden) und eine thermogravimetrisch bestimmte Menge Wasser sind mit Vaseline als Grundlage kombiniert und neben weiteren Variationen dieser Rezeptur A strukturanalytischen Untersuchungen unterworfen worden.

Zwar enthält die Modellrezeptur A die ermittelten Gehälter an Wasser, Glycerolmonostearat und Octyldodecanol, aber schon in den lichtmikroskopischen Aufnahmen ist erkennbar, dass die Rezeptur B, die mehr Glycerolmonostearat und Wasser enthält, der Dermatop[®] Salbe am nächsten kommt. Dieses Ergebnis wird durch die kalorimetrischen Daten und die Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie unterstützt: Die Vorbehandlung des Stratum corneum mit der Rezeptur B führt zu einer Senkung der Umwandlungstemperatur bei 80 °C. Zudem bleibt die Fernordnung bei 6,4 nm erhalten. Außerdem entsteht eine weitere Interferenz bei 5,9 nm. Die kalorimetrischen und röntgenografischen Daten stellen insgesamt heraus, dass Glycerolmonostearat nur in Kombination mit Octyldodecanol einen der Dermatop[®] Salbe ähnlichen Effekt auf die Lipidmatrix des Stratum corneum hat.

Insgesamt stellt sich die Wahl der beiden Hilfsstoffe, als diejenigen mit permeationsfördernden Eigenschaften auf das Stratum corneum, als richtig heraus. Allerdings lässt sich durch das unterschiedliche Abschneiden der Rezepturen A bis C in den

mikroskopischen und kalorimetrischen Untersuchungen ein wesentlicher Einfluß des Mengenverhältnisses der beiden Stoffe zueinander vermuten. Die Frage, warum die Rezeptur A nicht die Anforderungen in dem Maße erfüllen kann, wie die Rezeptur B, kann abschließend nicht geklärt werden. Hier müssen sowohl Methodenfehler in der Säulen- oder Gaschromatographie, mögliche stark synergistische Mechanismen zwischen Wasser und Glycerolmonostearat aber auch unterschiedliche Stoffeigenschaften zwischen Ölsäure und Stearinsäure in Betracht gezogen werden.

Mit dem Permeationsexperiment kann letztendlich bewiesen werden, dass die Rezeptur B vergleichbare Permeationseigenschaften aufweist wie die Original-Zubereitungen Dermatop[®] Salbe, Fettsalbe und Creme.

5 Abschlussdiskussion

5.1 Einfluss von Isopropylmyristat, Isopropylalkohol und deren Kombination in wasserhaltiger hydrophiler Salbe auf excidiertes humanes Stratum corneum

Der Soventol[®] Creme (Dr. Rentschler Arzneimittel GmbH & Co, D-Laupheim) wurde bereits in einer früheren Studie eine bessere Freisetzung von Hydrocortisonacetat im Vergleich zu anderen Fertigarzneimitteln zugeschrieben (Alberg, 1998). In diesem Zusammenhang wurde auf eine verbesserte Arzneimittelbereitstellung aufgrund der darin enthaltenen Hilfsstoffe geschlossen (Neubert und Pöttsch, 2004). In der Soventol[®] Creme sind Isopropylmyristat und Isopropylalkohol die permeationsfördernden Hilfsstoffe. Es sollte nun geklärt werden, ob diese permeationsfördernden Stoffe wirkstoffunabhängig agieren, also auch im Falle von Hydrocortison oder Prednicarbat wirken. Daneben galt es, die Wirkmechanismen sowohl der Einzelstoffe als auch deren Kombination zu untersuchen.

Neben den Permeationsdaten ist schon anhand der gemessenen Sättigungskonzentration von Hydrocortison in den Lösungsmitteln (Isopropylmyristat, Isopropylalkohol), den Vehikeln und im Stratum corneum erkennbar, dass die Additiva als Einzelsubstanzen und auch als Kombination unterschiedliche Effekte auf die Lipidmatrix des Stratum corneum haben müssen. Durch kalorimetrische und röntgenographische Daten können diese Strukturveränderungen der Lipidmatrix näher charakterisiert werden.

Isopropylmyristat führt zu einer Verringerung der Interferenzen im Nahbereich. Gleichzeitig können Shifts beider Umwandlungstemperaturen in der Differential Scanning Calorimetry gemessen werden. Letzterer Befund kann zunächst nur als Umordnung und nicht, wie von anderen Autoren (Leopold und Lippold, 1995), als vollständige Fluidisierung interpretiert werden. So erklärt sich die geringe Sättigungskonzentration von Hydrocortison im Stratum corneum vor allem durch eine Insertion von Isopropylmyristat in die Hydrocarbon-Reste der Lipide. Durch diese Ordnungssteigerung und dichtere Packung wird eine verstärkte Permeationsbarriere für Hydrocortison geschaffen.

Isopropylalkohol hingegen führt in dem Vehikel zu einer starken Erhöhung der Sättigungskonzentration des Arzneistoffes, während im Stratum corneum die gleiche Hydrocortison-Sättigungskonzentration wie bei der Behandlung mit wirkstoffhaltiger wasserhaltiger hydrophiler Salbe erreicht wird. Die erhöhte Sättigungskonzentration im Vehikel bewirkt die von Neubert und Pöttsch (2004) postulierte erhöhte Arzneistoffbereitstellung. Wenn mit einer erhöhten Sättigungskonzentration von

Hydrocortison durch Isopropylalkohol in der Formulierung höhere Permeationsraten erreicht werden, dann muss das Stratum corneum als permeationslimitierende Barriere (Refai, 2001) durch den Isopropylalkohol umstrukturiert worden sein. Zudem ist über die Kalorimetrie und Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie eine Abhängigkeit der Wirkung des Alkohols von dem Wassergehalt in der Stratum corneum-Probe ermittelt worden. Letztlich ist aber mit steigendem Alkoholanteil ein Verschwinden der Fernordnung und damit der Lamellarstruktur allgemein verantwortlich für die erhöhte Permeationsrate.

Durch die Kombination beider Substanzen wird die Sättigungslöslichkeit von Hydrocortison im Vehikel in gleicher Weise wie durch alleinigen Alkoholzusatz erhöht. Allerdings ist die Permeationsrate von Hydrocortison höher als die aus wasserhaltiger hydrophiler Salbe mit Isopropylalkoholanteil. Somit ist ein zusätzlicher Effekt auf die Lipidmatrix des Stratum corneum zu erwarten. Tatsächlich führt die Kombination aus diesen beiden Hilfsstoffen zu einem Ausbleiben der Interferenz im Nahbereich orthorhombisch angeordneter Lipide, weshalb von einer Störung dieser Lipidfraktion ausgegangen werden kann, die als Fluidisierung des Lamellarbereiches zu verstehen ist. Im Hinblick auf die zusätzlich erhöhte Permeation von Hydrocortison durch humanes Stratum corneum wirken diese beiden Substanzen demnach synergistisch. Über den molekularen Aufbau dieser Enhancer-Kombination lassen sich mithilfe dieser Methoden und auch aufgrund des komplexen Aufbaus der Stratum corneum-Lipidstruktur keine konkreten Aussagen treffen.

5.2 Einfluss von Hydrocortison-Fertigarzneimittel auf das Stratum corneum

Auf dem Markt sind verschiedene Hydrocortison Salben und Cremes. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzungen, sind Aussagen über den Einfluss bestimmter Inhaltsstoffe auf die Lipidmatrix des Stratum corneum nur bedingt machbar.

Es ist jedoch auffällig, dass alle Formulierungen unabhängig von Konzentration und Vehikel den gleichen Flux besitzen. Entsprechend der Arbeit von Refai (2001), ist dieses auf die Stratum corneum Barriere, die geschwindigkeitsbestimmend ist, zurückzuführen. Da aber nur für zwei Fertigarzneimittel die wirkstofffreien Grundlagen zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Hydrocortison in diesen Vehikeln zur Verfügung stand, können im Prinzip auch nur diese beiden Fertigarzneimittel miteinander verglichen werden. So ergeben sich durch die unterschiedlichen Löslichkeiten in den Formulierungen trotz gleicher Fluxraten Unterschiede in den PerSol-Koeffizienten. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch die

anderen Fertigarzneimittel unterschiedliche Sättigungskonzentrationen für Hydrocortison besitzen und damit unterschiedliche PerSol-Koeffizienten aus den Permeationen resultieren.

Die Thermogramme, die nach der Vorbehandlung des Stratum corneum mit den verschiedenen Formulierungen aufgenommen worden waren, fallen hingegen sehr unterschiedlich aus. Letztlich kann ein Effekt einer Gesamtformulierung auf das Stratum corneum nicht auf einzelne Inhaltsstoffe zurückgeführt werden. Dennoch können für die Ratiopharm-Produkte, die im Vergleich zur Hydrocutan Salbe Glycerol enthalten, höhere Sättigungslöslichkeiten für Hydrocortison im Vehikel und damit auch niedrigerere PerSol-Koeffizienten bestimmt werden. Außerdem werden durch das darin enthaltene Glycerol beide Umwandlungstemperaturen in den Thermogrammen deutlich erniedrigt. Des weiteren kann über einen Vergleich der Thermogramme zwischen der Hydrocutan Salbe und der Hydrogalen[®] Salbe ein Einfluss des Emulgatorkomplexes der Hydrocutan Salbe auf die Stratum corneum-Lipidfraktionen nachgewiesen werden.

5.3 Einfluss von Glycerol, Propylenglykol und einer Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat auf die Stratum corneum-Lipide

Da in einigen Hydrocortison-Fertigarzneimitteln Glycerol, Propylenglykol oder auch eine Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat deklariert ist, war es naheliegend, den Einfluss dieser Substanzen auf die Lipidmatrix des Stratum corneum näher zu klären und etwaige Zusammenhänge mit den Thermogrammen der Fertigarzneimittel herzustellen.

Glycerol weitet die Interferenz orthorhombisch geordneter Lipide auf, während Propylenglykol die der hexagonalen Lipidstrukturen im Nahordnungsbereich erhöht. Beide bewirken neben der Interferenz von 6,4 nm die Bildung einer weiteren Interferenz im Kleinwinkelbereich bei etwa 8,9 nm. Letztgenannter Befund wurde in der Literatur (Bouwstra, 1991b; Bouwstra et al., 1996) bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit erfolgte durch die Vorbehandlung mit Propylenglykol außerdem eine Aufweitung der Interferenzen im Nahbereich. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass durch diese Substanzen, die sich geringfügig in ihrer Stereochemie unterscheiden, die Lamellarstruktur lateral und senkrecht aufgeweitet wird.

Schon bei der Auswertung der Shifts der Umwandlungstemperaturen in der Differential Scanning Calorimetry ist ein synergistischer Wirkmechanismus der Kombination aus Isopropylmyristat und Propylenglykol erkennbar. Die Vorbehandlung mit der Kombination führt zwar zu einem relativ großen Shift beider Umwandlungstemperaturen, aber diese Shifts

entsprechen nicht den Summen der Shifts, die sich nach der Vorbehandlung durch die Einzelsubstanzen ergeben.

Zudem kommt es zu einer starken Aufweitung hexagonal geordneter Lipidfraktionen, während durch die Vorbehandlung mit dieser Kombination die Fernordnung unbeeinflusst bleibt. Die Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat wirkt demnach als Kombination über eine laterale Insertion in die Lipidkopfgruppenregion mit einer entsprechenden Aufweitung in dieser Dimension. Offenbar kommt dem Isopropylmyristat hier eine helfende Rolle für das Propylenglykol zu, welches sich durch die Insertion von Isopropylmyristat wenigstens teilweise in den Lipidregionen der Lamellarphasen aufhalten kann.

Die Shifts, die durch die Vorbehandlung mit den Fertigarzneimitteln verursacht werden, sind nicht so hoch wie die nach Vorbehandlung mit den Reinsubstanzen Propylenglykol, Glycerol und Isopropylmyristat. Da eine Senkung der Umwandlungstemperaturen auch von der Konzentration abhängt, wie schon in Kap. 4.1.1.3 mit unterschiedlichen Isopropylalkohollösungen erläutert, ist davon auszugehen, dass in den Fertigarzneimittel-Rezepturen die jeweilige Konzentration an Glycerol, Propylenglykol oder Isopropylmyristat für eine detektierbare Veränderung der Stratum corneum-Lipidmatrix nicht ausreicht. Hinzu kommen etwaige synergistische Effekte mit weiteren Hilfsstoffen, die hier nicht weiter untersucht worden sind.

Damit ist zwar eine leichte Veränderung der Stratum corneum-Lipide denkbar, aber, wie an den Fluxdaten der Fertigarzneimittel-Permeationen ersichtlich, reicht diese nicht zu einer detektierbaren Permeationsförderung. Lediglich eine Veränderung der Sättigungskonzentration von Hydrocortison in den Vehikeln ist wahrscheinlich und in zwei Fällen (Dermallerg ratiopharm[®] Creme 1% und Hydrocutan Salbe) bewiesen worden.

5.4 Einfluss von Prednicarbat-Fertigarzneimitteln auf das Stratum corneum und Hautkonstrukte

Bisher wurden Permeationen mit excidiertem humanem Stratum corneum durchgeführt. Da sich aber die Permeation von Prednicarbat durch dieses Gewebe, wie auch von Beutler (1993) beschrieben, aufgrund der hohen Lipophilie des Arzneistoffes als sehr gering herausstellte, ist auf entsprechende Dermisäquivalente ausgewichen worden. In einigen Studien ist die höhere Durchlässigkeit der Hautkonstrukte gegenüber excidiertem humanem Stratum corneum charakterisiert worden (Schmook et al., 2001; Specht, 1999). Dieses sollte nun auch für

Prednicarbat erarbeitet werden. Da dieser Arzneistoff zur vollen pharmakologischen Wirkung metabolisiert werden muss, sollte auch dieses im Vergleich der beiden Gewebe beschrieben werden. Das Hauptaugenmerk galt aber dem Vergleich der Effekte der verschiedenen Grundlagen sowie deren Rezepturen auf die Lipidmatrix des Stratum corneums und die Permeation von Prednicarbat.

Zunächst sollte eine Metabolisierungsstudie klären, ob excidiertes humanes Stratum corneum metabolische Aktivität besitzt und wie stark die Metabolisierung von Prednicarbat durch die Hautkonstrukte ausgeprägt ist. Schließlich stellt das Stratum corneum für Prednicarbat sowohl eine Barriere als auch ein Reservoir dar (Kellner et al., 1986). An Monolayer-Konstrukten wurde bereits beobachtet, dass Betamethason und seine Isomere unterschiedlich schnell abgebaut werden. Dieses war mit in-vivo-Daten korrelierbar und zeigte auch, dass zu dieser Metabolisierung eine zusätzliche chemische Degradation gehören kann (Kubota et al., 1994). Der Metabolisierungsvergleich mit Prednicarbat wurde in einem Medium durchgeführt, das für die Kultivierung der Hautkonstrukte notwendig ist. Da dieses einen kleinen Anteil Kälberserum und in diesem Enzyme enthielt, konnte der Abbau des Prednicarbats bereits im Medium stattfinden. Dennoch wurde keine wesentliche metabolische Aktivität durch excidiertes humanes Stratum corneum gefunden. Die Hautkonstrukte hingegen bauen Prednicarbat aus dem Medium ab. Hier deckt sich die Metabolisierung mit den Beobachtungen während der Permeationen. So wird Prednicarbat zu Prednisolon-17-ethylcarbonat abgebaut. Dessen Konzentration bleibt auf niedrigem Niveau konstant, da es durch eine chemische Transformation zum Prednisolon-21-ethylcarbonat umgebaut wird. Die Konzentration dieses Derivates steigt zunächst stark an, befindet sich dann aber nach ein paar Stunden in einer Plateauphase, da es gleichzeitig enzymatisch zum Prednisolon abgebaut wird. Dieses Endprodukt reichert sich dann auch stetig in dem Akzeptormedium an. Nun müssen bei dem Vergleich der Permeations- mit den Metabolisierungsergebnissen die unterschiedlichen Versuchsaufbauten bedacht werden. Zum einen befinden sich die Konstrukte während der Permeation zwischen Zubereitung und Akzeptorflüssigkeit. Dieses entspricht nicht den optimalen Nährbedingungen im Medium. Zum anderen zeichnet sich der Permeationsvergleich zwischen Stratum corneum und Dermisäquivalent durch die unterschiedliche Barrierequalität von Stratum corneum und Konstrukt aus. Durch das Konstrukt ist die Permeation größerer Arzneistoffmengen möglich. Hervorzuheben ist, dass dessen Stratum corneum als Barriere intakt und damit geschwindigkeitsbestimmend ist. Das schlägt sich in derselben Permeationsrangfolge, Salbe gefolgt von Fettsalbe und Creme, für Hautkonstrukt und Stratum corneum nieder. Somit ist die Übertragung der Ergebnisse aus

Hautkonstrukt-Permeationen auf das humane Stratum corneum zulässig. Der Metabolisierungsvergleich hingegen bewertet die Fähigkeit zum Prednicarbat-Abbau und damit die Menge an Enzymen. Insgesamt ist hiermit bewiesen worden, dass das Hautkonstrukt eine schwache Permeationsbarriere besitzt und den Arzneistoff Prednicarbat gleichzeitig abbaut, wobei die Vitalität der Zellen im Laufe des Permeationsexperimentes gegenüber der Kultivierungsphase abnimmt.

Auf dem Arzneimittelmarkt sind Dermatop[®] Salbe, Creme und Fettsalbe sowie die jeweiligen Basisformulierungen. Damit können sowohl Intervalltherapien als auch individuelle Rezepturen mit diesen Formulierungen durchgeführt werden. Der Permeationsvergleich der Hautkonstrukte zeigt eine klare Rangfolge von Salbe, Fettsalbe und Creme. Dieses deckt sich mit Ergebnissen von Gysler (1998), in denen Prednicarbat aus der Fettsalbe im Vergleich zur Creme besser permeierte. Daraus wurde auf einen permeationsfördernden Effekt der Fettsalbe durch Okklusion geschlossen. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Permeationsstudie kann diese Annahme allerdings widerlegt werden, da die Salbe als W/O Cremeformulierung mit geringerem Okklusionseffekt eine noch bessere Permeation von Prednicarbat gewährleistet. Während sich die Sättigungskonzentrationen im Stratum corneum nach der Vorbehandlung mit unterschiedlichen Vehikeln nicht unterscheiden, ist über die Röntgenweitwinkelbeugung eine Aufweitung der Interferenzen für orthorhombisch gepackte Lipide durch die Salbe zu beobachten. Zudem führt im Fernordnungsbereich die Salbe, im Gegensatz zu der Fettsalbe und der Creme, zu einer leichten Intensitätszunahme der Interferenz von 6,7 nm. Fettsalbe und Creme modifizieren ebenfalls die Stratum corneum-Lipide: Zum einen weitet die Fettsalbe beide Interferenzen im Nahbereich, zum anderen werden die Umwandlungstemperaturen in der Differential Scanning Calorimetry durch die Creme gesenkt. Damit kann jede dieser Zubereitungen zwar einen Beitrag zur Modifizierung der Lipidmatrix leisten, aber nur die Salbe führt zu einer Permeationssteigerung.

Eine Verdünnung der Grundlagen mit ihren jeweiligen Basisformulierungen führte im Falle der Creme und Fettsalbe verglichen mit den Permeationen der Original-Formulierungen zu keinem Effekt. Für die verdünnte Salbe konnte eine geringere Permeation festgestellt werden. Hier kann davon ausgegangen werden, dass nicht mehr die Stratum corneum-Barriere sondern die Prednicarbat-Konzentration geschwindigkeitsbestimmend war. Auch dieses Ergebnis deutet auf eine modifizierende Eigenschaft der Salbe auf die Stratum corneum-Lipidmatrix hin.

Wird die Salbe mit der Creme bzw. mit der Fettsalbe gemischt, so liegen diese Permeationsergebnisse zwischen denen der Original-Formulierungen. Damit kann einerseits

ein Hydratisierungseffekt im Vergleich der Salbe mit der Fettsalbe detektiert werden. Andererseits ist von Hilfsstoffeffekten auf die Permeation von Prednicarbat auszugehen. Dennoch ist der Permeationskoeffizient der Mischung Fettsalbe/Salbe signifikant höher als der der Mischung Salbe/Creme. Dieses wird durch die Sättigungskonzentration im Stratum corneum und durch Röntgenweitwinkeldaten unterstützt. Allerdings modifiziert auch die Mischung Salbe/Creme beide Lipidfraktionen im Nahbereich.

Werden die Vehikel mit Isopropylalkohol und Isopropylmyristat versetzt, so wird erst durch die Einbeziehung der Arzneistoff-Konzentration in die Berechnungen eine bessere Permeation bemerkbar. Eine Erklärung dafür liegt in dem schwächer ausgebildetem Stratum corneum der Hautkonstrukte, das damit auch nur eine geringere Permeationssteigerung ermöglichen kann. Da die Ergebnisse der Röntgenweitwinkelbeugung nach der Vorbehandlung mit den modifizierten Grundlagen anders ausfallen als nach der Vorbehandlung mit den Originalformulierungen, kann auf einen synergistischen Effekt der Hilfsstoffe der Zubereitungen mit den Enhancer-Substanzen geschlossen werden. Unterstützt wird dieser Gedanke durch den Vergleich der Röntgenkleinwinkeldaten der wasserhaltigen hydrophilen Salbe, versetzt mit der Enhancer-Kombination, mit den modifizierten Dermatop[®] Grundlagen. Diese führen nicht zu einem Verlust der 6,7 nm Interferenz, wie das nach Behandlung mit der modifizierten wasserhaltigen hydrophilen Salbe der Fall ist, sondern zu einer Verstärkung.

5.5 Charakterisierung von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol als mögliche permeationsfördernde Substanzen in der Dermatop[®] Salbe hinsichtlich ihres Einflusses auf Stratum corneum

In der Dermatop[®] Salbe sind unter anderem Glycerolmonooleat und Octyldodecanol, welches laut einem Firmenprospekt zur Penetrationssteigerung zugesetzt wird, enthalten. Da die Salbe eine stärkere Permeation durch Hautkonstrukte und auch Stratum corneum ermöglicht, sollte geklärt werden, ob diese beiden Hilfsstoffe zusammen oder als Einzelsubstanzen für die Permeationsförderung verantwortlich gemacht werden können.

Nach einer gaschromatographischen Gehaltsanalyse sind drei Modellrezepturen aufgestellt worden, sowie zwei Rezepturen, die nur aus Vaseline und den jeweiligen Einzelsubstanzen bestanden (Glycerolmonooleat musste durch Glycerolmonostearat ersetzt werden). Schon die mikroskopischen und kalorimetrischen Untersuchungen lassen auf eine Ähnlichkeit der Rezeptur B mit der Dermatop[®] Salbe, sowohl im strukturanalytischen als auch Stratum corneum beeinflussenden Sinne, schließen. Im Vergleich der kalorimetrischen und

röntgenografischen Daten stellt sich zudem heraus, dass die Vorbehandlung des Stratum corneum mit der Rezeptur B andere, der Dermatop[®] Salbe ähnlichere, Ergebnisse liefert, als die der Rezepturen GMS und O. Allerdings enthält die Rezeptur B die Substanzen Glycerolmonostearat und Octyldodecanol in einem anderen Mengenverhältnis als gaschromatographisch bestimmt worden war. Die Gründe dafür könnten sowohl in Methodenfehler während der Auftrennung und Detektion als auch einem eigenständigen Mechanismus zwischen Wasser und Glycerolmonostearat, deren Gehalte in der Rezeptur B erhöht worden waren, liegen.

Insgesamt kann von einem synergistischen Effekt der Substanzen Glycerolmonostearat und Octyldodecanol ausgegangen werden. Solche Effekte zweier Substanzen auf die Permeation durch Stratum corneum sind schon in Kapitel 4.1, aber auch bereits von Loftsson (1989) beschrieben worden. Das Mengenverhältnis von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol zueinander erweist sich dabei als wichtiger Faktor. Letztendlich permeiert Prednicarbat aus der Rezeptur B mit einem höheren Permeationskoeffizienten im Vergleich zur Dermatop[®] Salbe.

6 Zusammenfassung

Alle untersuchten kommerziellen Hydrocortison-Fertigarzneimittel erwiesen sich hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens als gleichwertig. Am Beispiel zweier Formulierungen wurden jedoch unterschiedliche Sättigungskonzentrationen und damit gleichfalls unterschiedliche Persol-Koeffizienten berechnet. Es kann prinzipiell davon ausgegangen werden, dass veränderte Sättigungskonzentrationen unterschiedliche PerSol-Koeffizienten zur Folge haben und damit Permeationsdaten anders gewichtet werden müssen. Schließlich sind in den Thermogrammen Unterschiede im Einfluss der Vehikel auf das Stratum corneum festgemacht worden, die aufgrund der geringen Konzentration der jeweiligen Hilfsstoffe in den Vehikeln nicht auf einzelne Stoffe zurückgeführt werden konnten.

Aus der quantitativen Analyse der Inhaltsstoffe in den untersuchten Fertigarzneimitteln folgte eine Bestimmung der strukturanalytischen Effekte von Glycerol, Propylenglykol und einer Kombination aus Propylenglykol und Isopropylmyristat auf die Lipidmatrix des Stratum corneum. Hier sind die Effekte dieser Einzelsubstanzen und der Kombination auf das Stratum corneum ermittelt worden. In diesem Falle besitzt die Kombination aus den beiden Stoffen einen eigenen völlig anderen Mechanismus als die Einzelstoffe. Allerdings sind die Konzentrationen dieser Hilfsstoffe möglicherweise zu gering, um als permeationsfördernder Effekt in den jeweiligen Fertigarzneimitteln nachgewiesen werden zu können.

Die Soventol[®] Creme enthält den Wirkstoff Hydrocortisonacetat und ist bereits für Hydrocortison als permeationsfördernde Grundlage eingestuft worden. Als permeationsfördernde Hilfsstoffe sind Isopropylmyristat und Isopropylalkohol näher charakterisiert worden: Während durch einen Zusatz an Isopropylmyristat die Permeationsrate aufgrund der Insertion von Isopropylmyristat und damit erhöhter Lipidbarriere sank, vermochte zugesetzter Isopropylalkohol durch eine erhöhte Fluidität der Lipidregionen im Stratum corneum die Hydrocortison-Permeation zu erhöhen. Die Kombination beider Substanzen wirkt im Gegensatz zu der Verwendung als Einzelsubstanzen, synergistisch zueinander. Mit der Kombination dieser Hilfsstoffe kann eine noch größere Fluidisierung der Lipide im Stratum corneum und daraus resultierend die höchste Permeationsrate erzielt werden.

Als Vertreter einer neueren Generation an Glukokortikoiden ist das Prednicarbat in den Dermatop[®] Produkten untersucht worden. Da der Wirkstoff in der Haut sowohl aktiviert als auch zu einem unwirksamen Derivat metabolisiert wird, wurde die metabolische Aktivität von excidiertem humanem Stratum corneum im Vergleich zu den Hautkonstrukten untersucht.

Stratum corneum metabolisiert diesen Arzneistoff nicht wesentlich, während die Konstrukte als lebende Zellen beinhaltende Dermisäquivalente eine hohe metabolische Aktivität aufweisen. Im Laufe der Permeationen durch Hautkonstrukte konnten so die Veränderungen der Mengen der verschiedenen Derivate dokumentiert werden. Im Vergleich der Permeationen sowohl durch Stratum corneum als auch durch Konstrukte permeiert Prednicarbat aus der Dermatop[®] Salbe besser als aus der Creme und der Fettsalbe, wodurch die Übertragbarkeit weiterer Permeationsdaten von Konstrukten auf humanes Stratum corneum gegeben ist. Eine Verdünnung der Formulierung auf den halben Arzneistoffgehalt führt im Falle der Creme und der Fettsalbe zu keiner Erniedrigung der permeierten Arzneistoffmenge. Bei Verdünnung der Salbe hingegen ist dieses feststellbar, so dass hier die Prednicarbat-Konzentration geschwindigkeitsbestimmend ist. Mischungen aus Salbe und Fettsalbe, die einen Hydratationseffekt verursachen, bzw. Salbe und Creme, zur Abklärung weiterer permeationserhöhender Stoffe, ergaben keine Permeationsverbesserung im Vergleich zu den Original-Formulierungen. Nur durch den Zusatz an Isopropylmyristat und Isopropylalkohol kann eine Permeationserhöhung der Salbe erreicht werden. Diese Verbesserung fällt allerdings nicht so eindeutig aus, wie bei der Permeation von Hydrocortison durch excidiertes humanes Stratum corneum. Hier ergaben strukturanalytische Daten des entsprechend vorbehandelten Stratum corneum, dass diese Zusatzstoffe Interaktionen mit den Hilfsstoffen der Salbe eingehen. Die Ergebnisse sind insofern mit denen der Hydrocortison-Permeationen nicht vergleichbar.

Hinsichtlich ihrer Einflussnahme auf die Stratum corneum-Lipidstruktur wurden Glycerolmonooleat und Octyldodecanol als permeationsmodifizierende Stoffe in der Dermatop[®] Salbe charakterisiert. Auch in der Kombination von Glycerolmonostearat und Octyldodecanol waren diese beiden Stoffe in einer Modellrezeptur in der Lage, den Effekt der Dermatop[®] Salbe zu erreichen.

7 Literaturverzeichnis

- Aalto-Korte, K., Improvement of skin barrier function during treatment of atopic dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 33 (1995) 969-972
- Aalto-Korte, K., Turpeinen, M., Pharmacokinetics of topical hydrocortisone at plasma level after applications once or twice daily in patients with widespread dermatitis, *Br. J. Derm.* 133 (1995) 259-263
- Alberg, U., Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB mit suspendiertem Hydrocortisonacetat – Einfluß von Ethanol auf die Mikrostruktur der Cremes, Arzneistofffreigabe und Arzneistoffpermeation durch humanes Stratum corneum, Dissertation TU Braunschweig (1998)
- Allenby, A.C., Creasey, N.H., Edginton, J.A.G., Fletcher, J.A., Schock, C., Mechanism of action of accelerants on skin penetration, *Br. J. Dermatol.* 81 (1969) 47-55
- Aungst, B.J., Rogers, N.J., Shefter, E., Enhancement of naloxone through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides, *Int. J. Pharm.* 33 (1986) 225-234
- Aungst, B.J., Structure/effect studies of fatty acid isomers as skin penetration enhancers and skin irritants, *Pharm. Res.* 6 (3) (1989) 244-247
- Aungst, B.J., Blake, J.A., Hussain, M.A., Contributions of drug solubilization, partitioning, barrier disruption, and solvent permeation to the enhancement of skin permeation of various compounds with fatty acids and amines, *Pharm. Res.* 7 (7) (1990) 712-718
- Barry, B.W., Dermatological formulations: Percutaneous absorption, Marcel Dekker Inc., New York, 1983, S.172
- Barry, B.W., Bennett, S.L., Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin, *J. Pharm. Pharmacol.* 39 (1987) 535-546
- Barry, B.W., Mode of action of penetration enhancers in human skin, *J. Contr. Rel.* 6 (1987) 85-97
- Barry, B.W., Action of skin penetration enhancers – the lipid protein partitioning theory, *Int. J. Cosmet. Sci.* 10 (1988) 281-293
- Barry, B.W., Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement, *J. Contr. Rel.* 15 (1991) 237-248

- Barry, B.W., Vehicle effect: what is an enhancer? in: Shah, P.V., Maibach, H., Topical bioavailability, bioequivalence and penetration, Plenum Press, New York, 1993, S. 274
- Barry, B.W., Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 101-104
- Bentley, M.V.L.B., Kedor, E.R.M., Vianna, R.F., Collett, J.H., The influence of lecithin and urea on the in vitro permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse, *Int. J. Pharm.* 146 (1997) 255-262
- Beutler, M., Prednicarbat, *Pharma-Kritik* 15 (15) (1993) 58-59
- Boddé, H.E., van den Brink, I., Koerten, H.K., de Haan, F.H.N., Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride; transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes, *J. Contr. Rel.* 15 (1991) 227-236
- Bonina, F.P., Carelli, V., Di Colo, G., Montenegro, L., Nannipieri, E., Vehicle effects on in vitro skin permeation of and stratum corneum affinity for model drugs caffeine and testosterone, *Int. J. Pharm.* 100 (1993) 41-47
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., van der Spek, J.A., Bras, W., Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering, *J. Invest. Dermatol.* 97 (1991a) 1005-1012
- Bouwstra, J.A., de Vries, M.A., Gooris, G.S., Bras, W., Brussee, J., Ponec, M., Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier, *J. Contr. Rel.* 15 (1991b) 209-220
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Bras, W., The structure of the lipids in human stratum corneum and the effect of water and penetration enhancers on this structure. *Proceed. Intern. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 18 (1991c) 187-188
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Salomons-de Vries, M.A., van der Spek, J.A., Bras, W., Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study, *Int. J. Pharm.* 84 (1992a) 205-216
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Brussee, J., Salomons-de Vries, M.A., Bras, W., The influence of alkylazones on the ordering of the lamellae in human stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 79 (1992b) 141-148

- Bouwstra, J.A., Salomons-de Vries, M.A., van den Bergh, B.A.I., Gooris, G.S., Changes in lipid organisation for the skin barrier by N-alkyl-azocycloheptanones: a visualisation and X-ray diffraction study, *Int. J. Pharm* 144 (1996) 81-89
- Bouwstra, J.A., The skin, a well-organized membrane. *Colloids surfaces A: physicochem. Eng. Aspects* 123-124 (1997) 403-413
- Bouwstra, J.A., Dubbelaar, F.E.R., Gooris, G.S., Ponc, M., The lipid organisation in the skin barrier, *Acta. Derm. Venerol.* 208 (2000) 23-30
- Breuer, M.M., The interaction between surfactants and keratinous tissues, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 30 (1979) 41-64
- Busse, M.J., Dangers of dilution of topical steroids, *Pharm. J.*, 14 (1978) 25-26
- Chantasart, D., Li, S.K., Warner, K.S., Prakongpan, S., Higuchi, W.I., Mechanistic studies of branched-chain alkanols as skin permeation enhancers, *J. Pharm. Sci.*, 93 (3) (2004) 762-779
- Cornwell, P.A., Barry, B.W., Stoddart, C.P., Bouwstra, J.A., Wide-angle X-ray diffraction of human stratum corneum: Effects of hydration and terpene enhancer treatment, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 938-950
- Cornwell P.A., Barry B.W., Bouwstra J.A., Gooris G.S. Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies, *Int. J. Pharm.* 127 (1996) 9-26.
- DAB 9 Kommentar, Deutscher Apotheker Verlag & Govi Verlag, Stuttgart und Frankfurt, 1986, S.1913
- Das Gupta, V., Effect of vehicles and other active ingredients stability of hydrocortisone, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1979) 299-302
- Davis, A.F., Hadgraft, J., Effect of supersaturation on membrane transport: 1. Hydrocortisone acetate, *Int. J. Pharm.* 76 (1991) 1-8
- de Haan, F.H.N., Boddé, H.E., de Bruijn, W.C., Ginsel, L.A., Junginger, H.E., Visualizing drug transport across stratum corneum: cryotechniques, vapor fixation, autoradiography, *Int. J. Pharm.* 56 (1989) 75-86

- El Tayar, N., Tsai, R.S., Testa, B., Carrupt, P.A., Hansch, C., Leo, A., Percutaneous penetration of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study, *J. Pharm. Sci.* 80(8) (1991) 744-749
- Elias, P.M., Goerke, J., Friend, D.S., Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure, *J. Invest. Dermatol.* 69 (1977) 535-546
- Elias, P.M., Epidermal lipids, membranes, and keratinization, *Int. J. Dermatol.* 20 (1981) 1-19
- Elias P.M., Bonar L., Grayson S., Baden H.P., X-ray diffraction analysis of stratum corneum membrane couplets, *J. Invest. Dermatol.* 80 (1983) 213-214
- Elias, P.M., Structure and function of the stratum corneum permeability barrier, *Drug Dev. Res.* 13 (1988) 97-105
- Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002, Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, GOVI-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, 2002, S.1971, 2548
- Feldmann, R.J., Maibach, H.I., Percutaneous penetration of steroids in man, *J. Invest. Dermatol.* 52 (1) (1969) 89-94
- Fiedler, H.P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Band 1, 4.Ausgabe, Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 1996, S. 601
- Francoer, M.L., Golden, G.M., Potts, R.O., Oleic acid: Its effects on stratum corneum in relation to (trans)dermal drug delivery, *Pharm. Res.* 7(6) (1990) 621-627
- Franz, T.J., Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data, *J. Invest. Dermatol.* 64 (3) (1975) 190-195
- Fritsch, P., Dermatologie, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1990, S. 11ff
- Funke, A.P., Schiller, R., Motzkus, H.W., Günther, C., Müller, R.H., Lipp, R., Transdermal delivery of highly lipophilic drugs: in vitro fluxes of antiestrogens, permeation enhancers, and solvents from liquid formulations, *Pharm. Res.* 19 (5) (2002) 661-668
- Garson, J.C., Doucet, J., Leveque J.L., Tsoucaris, G., Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction, *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991) 43-49

- Gay, C.L., Guy, R.H., Golden, G.M., Mak, V.H.W., Francoer, M.L., Characterisation of low-temperature (i.e., <65°C) lipid transition in human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 103 (1994) 233-239
- Golden, G.M., Guzek, D.B., Kennedy, A.H., McKie, J.E., Potts, R.O., Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties, *Biochemistry* 26 (1987a) 2382-2388
- Golden, G.M., McKie, J.E., Potts, R.O., Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux, *J. Pharm. Sci.* 76 (1) (1987b) 25-28
- Grasso, P., Some aspects of the role of skin appendages in percutaneous absorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 22 (1971) 523-534
- Grimnes, S., Pathways of ionic flow through human skin in vivo. *Acta Derm. Venerol.* 64 (1984) 93-98
- Gysler, A., Vergleichende Untersuchungen zur Biotransformation und Penetrationsverhalten halogenierter und nicht-halogenierter topischer Glucocorticoide, Dissertation Freie Universität Berlin (1998)
- Hansen, H.S., Jensen, B., Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinic acid and alpha-linolenate. *Biochim. Biophys. Acta* 834 (1985) 357-363
- Harada, K.H., Murakami, T., Yata, N., Yamamoto, S., Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs, *J. Invest. Dermatol.* 99 (1992) 278-282
- Hatta, I., Ohta, N., Ban, S., Tanaka, H., Nakata, S., X-ray diffraction study on ordered, disordered and reconstituted lipid lamellar structure in stratum corneum, *Biophys. Chem.* 89 (2001) 239-242
- Hein, R., Mauch, C., Hatamochi, A., Krieg, T., Influence of corticosteroid on chemotactic response and collagen metabolism of human skin fibroblasts, *Biochem. Pharmacol.* 37 (14) (1988) 2723-2729
- Hein, R., Korting, H.C., Mehring, T., Differential effect of medium potent nonhalogenated double-ester-type and conventional glucocorticoids on proliferation and chemotaxis of fibroblasts in vitro, *Skin Pharmacol.* 7 (1994) 300-306

- Higuchi, T., Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 11 (1960) 85-97
- Hirvonen J., Rajala R., Vihervaara P., Laine E., Paronen P., Urtti A., Mechanism and reversibility of penetration enhancer action in the skin - a DSC-study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 40(2) (1995) 81-85
- Hopf, G., Mathias, B., Glukokortikoid-Externa und Kontaktdermatits. *Münch. med. Wschr.* 131 (34) (1989) 595-599
- Hori, M., Satoh, S., Maibach, H.I., Classification for percutaneous penetration enhancers: a conceptional diagram, *J. Pharm. Pharmacol.* 42 (1990) 71-72
- Horsch, W., Kögel, J., Bombor, R., Zur in vitro-Liberation aus Suspensionssalben, *Pharmazie* 27 (1971) 185-186
- Horsch, W., Kögel, J., Schiefer, M., Einfluß der Versuchstemperatur auf die in-vitro-Liberation aus Salicylsäure-Suspensionssalben, *Pharmazie* 29 (1974) 63-64
- Horsch, W., Kögel, J., Kretzschmann, U., Nitzsche, R., Beiträge zur Liberation von Arzneistoffen aus Suspensionssalben, *Pharmazie* 30 (176) (1975) 303-306
- Hou, S.Y.E., Mitra, A.K., Wjite, S., Menon, G.K., Ghadially, R., Elias, P.M., Membrane structures in normal and essential fatty acid- deficient stratum corneum: Characterisation by ruthenium tetroxide staining and X-ray diffraction, *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991) 215-223
- Hueber, F., Wepierre, J., Schaefer, H., Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: in vivo study in the hairless rat, *Skin Pharmacol.* 5 (1992) 99-107
- Hüttenrauch, R., Fricke, S., Abhängigkeit der Wirkstoffabgabe aus Salben vom Ordnungsgrad der festen Phase, *Pharmazie* 34 (1979) 437-438
- Kattan, A.F., Asbill, C.S., Michniak, B.B., The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in HPMC gel systems, *Int. J. Pharm.* 198 (2000) 179-189
- Kattan, A.F., Asbill, C.S., Kim, N., Michniak, B.B., The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities, *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 229-240

- Kellner, H.M., Eckert, H.G., Fehlhaber, H.W., Hornke, I., Oekonomopoulos, R., Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zur Biotransformation nach topischer Anwendung des lokalen Kortikoids Prednicarbat, *Z. Hautkr.* 61 (1) (1986) 18-40
- Kim, D., Kim, J.L., Chien, Y.W., Mutual hairless rat skin permeation-enhancing effect of ethano/water system and oleic acid, *J. Pharm. Sci.* 85 (11) (1996) 1191-1195
- Kligman, A.M., Christophers, E., Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch. Dermatol.* 88 (1963) 702-705
- Knutson, K., Potts, R.O., Golden, G.M., McKie, J.E., Lambert, W.J., Higuchi, W.I., Macro- and molecular physical-chemical considerations in understanding drug transport in the stratum corneum, *J. Contr. Rel.* 2 (1985) 67-87
- Korting, H.C., Hülsebus, E., Kerscher, M., Greber, R., Schäfer-Korting, M., Discrimination of the toxic potential of chemically differing topical glucocorticoids using a neutral red release assay with human keratinocytes and fibroblasts, *Brit. J. Dermatol.* 133 (1995) 54-59
- Kranz, G., Schaefer, H., Zesch, A., Hydrocortisone (cortisol) concentration and penetration gradient, *Acta dermatovener* 57 (1977) 269-273
- Kubota, K., Ademola, J., Maibach, H.I., Metabolism of topical drugs within the skin, in particular glucocorticoids, in: Korting, H.C., Maibach, H.I., Topical glucocorticoids with increased benefit/risk ratio, *Curr. Probl. Dermatol. Basel*, Karger, 1993, vol. 21, 61-66
- Kubota, K., Ademola, J., Maibach, H.I., Metabolism and degradation of betamethasone17-valerate in homogenized living skin equivalent, *Dermatology* 188 (1994) 13-17
- Kuempel, D., Schwartzendruber, D.C., Squier, C.A., Wertz, P.W., In vitro reconstitution of stratum corneum lipid lamellae, *Biochim. Biophys. Acta* 1372 (1998) 135-140
- Landmann, L., Die Permeabilitätsbarriere der Haut, *Pharmazie in unserer Zeit* 4 (1991) 155-163
- Laugel, C., Baillet, A., Youenang Piemi, M.P., Marty, J.P., Ferrier, D., Oil-water-oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application: comparison with simple emulsions, *Int. J. Pharm.* 160 (1998) 109-117
- Lawlor, F., Black, K., Greaves, M., Prednicarbate 0.25% ointment in the treatment of atopic dermatitis: a vehicle-controlled double-blind study, *J. Dermatol. Treat.* 6 (1995) 233-235

- Lehmann, L., Keipert, S., Gloor, M., Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 129-136
- Leopold, C. S., Lippold, B.C., An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC), *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1995) 276-281
- Lippold, B.C., Selection of the vehicle for topical administration of drugs, *Pharm. Acta Helv.* 59 (5-6) (1984) 166-171
- Lippold, B.C., Hackemüller, D., The influence of skin moisturizers on drug penetration in vivo, *Int. J. Pharm.* 61 (1990) 205-211
- Lorenzetti, O.J., Propylene Glycol gel vehicles, *Cosmet. Dermatol.* 23 (1979) 747-750
- Loth H., Holla-Benninger, A., Hailer, M., Untersuchungen der Arzneistoffliberation aus Salben, *Pharm. Ind.* 41 (1979) 789-796
- Loth, H., Rugge-Wolff, I., Schäfer, U., Freisetzungen aus Suspensionssalben und Korngröße, *Acta Pharm. Technol.* 30 (2) (1984) 161-168
- Loth, H., Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen. *Acta Pharm. Technol.* 32 (3) (1986) 103-114
- Loth, H., Hauck, G., Borchert, D., Theobald, F., Statistical testing of drug accumulation in skin tissues by linear regression versus contents of stratum corneum lipids, *Int. J. Pharm.* 209 (2000) 95-108
- Lowe, N.J., Stoughton, R.B., Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation, *Brit. J. Dermatol.* 96 (1977) 155-162
- Madison, K.C., Schwartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Downing, D.T., Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 88 (1987) 714-718
- Maibach, H.I., Feldmann, R.J., Milby, T.H., Serat, W.F., Regional variation in percutaneous penetration in man, *Arch. Environ. Health* 23 (1971) 208-211
- Mak, V.H.W., Potts, R.O., Guy, R.H., Does hydration affect intercellular lipid organisation in the stratum corneum? *Pharm. Res.* 8 (8) (1991) 1064-1065

- Maltotsy, A.G., Downes, A.M., Sweeny, T.M., Studies of the epidermal water barrier. Part II. Investigation of the chemical nature of the water barrier, *J. Invest. Dermatol.* 50 (1) (1968) 19-26
- Malzfeldt, E., Lehmann, P., Goerz, G., Lippold, B.C., Influence of drug solubility in the vehicle on clinical efficacy of ointments, *Arch. Dermatol. Res.* 281 (1989) 193-197
- Miller, J.A., Munro, D.D., Topical corticosteroids: clinical pharmacology and therapeutic use, *Drugs* 19 (1980) 119-134
- Montes, L.F., Day, J.L., Wand, C.J., Kennedy, L., Ultrastructural changes in the horny layer following local application of dimethyl sulfoxide, *J. Invest. Dermatol.* 18 (2) (1967) 184-196
- Mutschler, E., *Arzneimittelwirkungen*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996, S. 603
- Neubert, R., Schmalfuß, U., Wohlrab, W., Huschka, C., Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation, *Pharm. Ztg.* 17 (1996) 1483-1493
- Neubert, R., Wohlrab, W., Marsch, W., *Dermatopharmazie, Vehikel-Wirkstoffe-Pharmakologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001, S. 106ff
- Neubert, R.H.H., Pötzsch, A., Topische Verfügbarkeit von Hydrocortisonacetat aus handelsüblichen halbfesten Formulierungen, *Pharmazie* 59 (2004) 472-474
- Nicolaides, N., Fu, H.C., Rice, G.R., The skin surface lipids of man compared with those of eighteen species of animals, *J. Invest. Dermatol.* 51 (3) (1968) 83-89
- Niedner, R., Ziegenmeyer, J., *Dermatika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992, S. 267, 272
- Niedner, R., Kortikosteroide bei Hautkrankheiten - externe und systemische Anwendung, *Der Bay. Int.* 13 (4) (1993) 3-11
- Niemi, L., Influence of ageing on hydrocortisone particles in o/w creams., *Acta Pharm. Nord.* 1 (5) (1989a) 259-268
- Niemi, L., Kahela, P., Turakka, L., Effect of water content and type of emulgator on the release of hydrocortisone from o/w creams, *Acta Pharm. Nord.* 1 (1) (1989b) 23-30

- Odland, G.F., A submicroscopic granular component in human epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 34 (1960) 11-15
- Ongpipattanakul, B., Burnette, R.R., Potts, R.O., Francoer, M.L., Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids, *Pharm. Res.* 8 (3) (1991) 350-354
- Oriba, H.A., Bucks, D.A.W., Maibach, H.I., Percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone on the vulva and forearm: effect of the menopause and site, *Brit. J. Dermatol.* 134 (1996) 229-233
- Panchagnula, R., Ritschel, W.A., Development and evaluation of intracutaneous depot formulation of corticosteroids using transcutol as a cosolvent: in-vitro, ex-vivo and in-vivo rat studies, *J. Pharm., Pharmacol.* 43 (1991) 609-614
- Pilgram, G.S.K., Engelsma-van Pelt, A.M., Bouwstra, J.A., Koerten, H.K., Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature, *J. Invest. Dermatol.* 113 (1999) 403-409
- Pilgram, G.S.K., Engelsma-van Pelt, A.M., Koerten, H.K., Bouwstra, J.A., The effect of two azones on the lateral lipid organization for human stratum corneum and its permeability, *Pharm. Res.* 17 (7) (2000) 796-802
- Plewig, G. Marples, R.R., Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. Part I, *J. Invest. Dermatol.* 54 (1) (1970) 13-18
- Potts, R.O., Francoer, M.L., The influence of stratum corneum morphology on water permeability, *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991) 495-499
- Potts, R.O., Guy, R.H., Predicting skin permeability, *Pharm. Res.* 9 (5) (1992) 663-669
- Preiss, A., Mehnert, W., Frömming, K.H., Penetration of hydrocortisone into excised human skin under the influence of cyclodextrins, *Pharmazie* 50 (1995) 121-126
- Refai, H., Dilution of semisolid preparations, Dissertation TU Braunschweig (2001)
- Rosado, C., Rodrigues, L.M., Solvent effects in permeation assessed in vivo by skin surface biopsy, *BMC Dermatology* 3 (5) (2003) 1-6

- Roth, H.J., Fenner, H., Pharmazeutische Chemie III. Arzneistoffe. Struktur-Bioreaktivität-wirkungsbezogene Eigenschaften, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1997, S. 555
- Rougier, A.R., Lotte, C., Maibach, H.I., In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic site in human: predictive assessment by the stripping method, J. Pharm. Sci. 76 (6) (1987) 451-454
- Sato, K., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Effect and mode of action of aliphatic esters on the in vitro skin permeation of nicorandil, Int. J. Pharm. 43 (1988) 31-40
- Schäfer, H., Zesch, A., Stüttgen, G., Skin permeability, aus: Ergänzungswerk 1. Band/4. Teil B Normale und pathologische Physiologie der Haut III, Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Springer-Verlag, Berlin, 1982, S. 583
- Schäfer-Korting, M., Korting, H.C., Kerscher, M.J., Lehnhard, S., Prednicarbate activity and benefit/risk ratio in relation to other topical glucocorticoids, Clin. Pharmacol. Ther. 54 (1993) 448-456
- Scheuplein, R.J., Blank, I.H., Permeability of the skin, Physiol. Rev. 51 (4) (1972) 702-747
- Schmook, F.P., Meingassner, J.G., Billich, A., Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption, Int. J. Pharm. 215 (2001) 51-56
- Schwartzendruber, D.C., Wetz, P.W., Kitko, D.J., Madison, K.C., Downing, D.Z., Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. J. Invest. Dermatol. 92 (1989) 251-257
- Shahi, V., Zatz, J.L., Effect of formulation factors on penetration of hydrocortisone through mouse skin, J. Pharm. Sci. 67 (1978) 789-792
- Shen, W.W., Danti, A.G., Bruscatto, F.N., Effect of nonionic surfactants on percutaneous absorption of salicylic acid and sodium salicylate in the presence of dimethyl sulfoxide, J. Pharm. Sci. 65 (12) (1976) 1780-1783
- Simonetti, O., Hoogstraate, A.J., Bialik, W., Kempenaar, J.A., Schrijvers, A.H.G.J., Boddé, H.E., Ponc, M., Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy, Arch. Dermatol. Res. 287 (1995) 465-473

- Smid-Korbar, J., Kristl, J., Srcic, S., Wirkstoff-freisetzung aus Dermatica. Pharmazie 37 (5) (1982) 363-365
- Smith, W.P., Christensen, M.S., Nacht, S., Gans, E.H., Effect of lipids on the aggregation and permeability of human stratum corneum, J. Invest. Dermatol. 78 (1) (1982) 7-11
- Southwell, D., Barry, B.W., Woodford, R., Variation in permeability of human skin within and between specimens, Int J. Pharm. 18 (1984) 299-309
- Specht, C., Entwicklung organotypischer Hautäquivalente und ihre Testung auf Eignung für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen, Dissertation TU Braunschweig (1999)
- Stefan, J.A., Linfert, M., Topische Therapie mit Prednicarbat: Eine Doppelblindstudie im Vergleich von einmaliger und zweimaliger täglicher Anwendung, Dt. Derm. 43 (1995) 450-455
- Stüttgen, G., Die biologische Funktion des Stratum corneum. Pharmakokinetische Bedingungen für die topische Applikation, in: Rietbrock, N. (Hrsg.), Die Haut als Transportorgan für Arzneistoffe, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990, S. 2
- Suhonen, T.M., Bouwstra, J.A., Urtti, A., Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations, J. Contr. Rel. 59 (1999) 149-161
- Surber, C., Davis, A. F., Bioavailability and bioequivalence of dermatological formulations in: Walters, K.A., Dermatological and transdermal formulations, Vol. 119, Marcel Dekker, New York, 2002, S.469
- Tanojo, H., Bouwstra, J.A., Junginger, H.E., Boddé, H.E., In vitro human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies, Pharm. Res. 14 (1) (1997) 42-49
- Tanojo, H., Bouwstra, J.A., Junginger, H.E., Boddé, H.E., Subzero thermal analysis of human stratum corneum, Pharm. Res. 11 (11) (1994) 1610-1616
- Thoma, K., Korting, H.C., Lechner, C., Nietsch, K.-H., Dermatop[®], Topisolon[®], Batrafen[®]; Rezepturvorschläge für Dermatika von Cassella-Riedel Pharma, 2.Auflage, Cassella-Riedel Pharma GmbH, Frankfurt am Main, 1993, S. 55

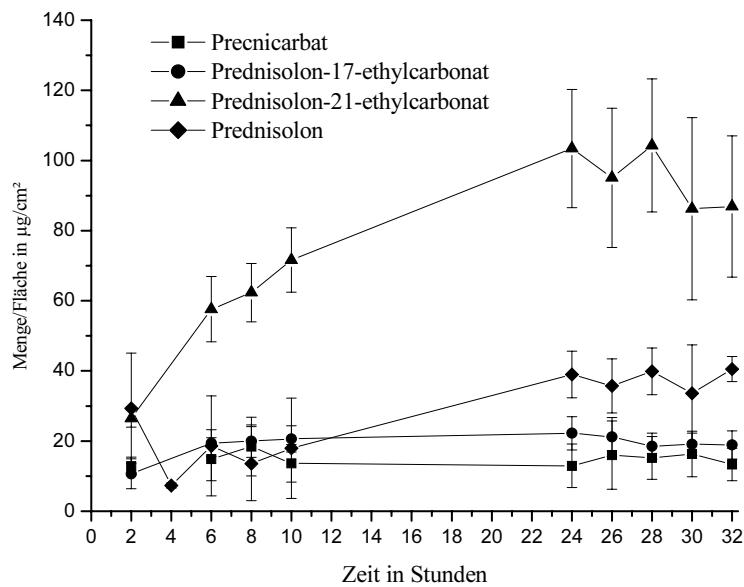
- Tiemessen, H.L.G.M., Boddé, H.E., van Mourik, C., Junginger, H.E., In vitro drug release from liquid crystalline creams; cream structure dependence, *Progress in Colloid and Polymer Science* 77 (1988) 131-135
- Touitou, E., Skin permeation enhancement by n-decyl methyl sulfoxide: effect of solvent systems and insights on mechanism of action, *Int. J. Pharm.* 43 (1988) 1-7
- van Duzee, B.F., Thermal analysis of human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 65 (1975) 404-408
- Vogt, H.J., Hydrocortison-Topika, *Deutsche Apotheker Zeitung* 137 (8) (1997) 43-46
- Walker, M., Hadgraft, J., Oleic acid - a membrane „fluidiser“ or fluid within the membrane? *Int. J. Pharm.* 71 (1991) R1-R4
- Walker, R.B., Smith, E.W., The role of percutaneous penetration enhancers, *Adv. Drug Delivery Rev.* 18 (1996) 295-301
- Walters, K.A., Walker, M., Olejnik, O., Non-ionic surfactant effects on hairless mouse skin permeability characteristics, *J. Pharm. Pharmacol.* 40 (1988) 525-529
- Wang, M.Y., Yang, Y.Y., Heng, P.W.S., Role of solvent interactions between fatty acids-based formulations and lipids in porcine stratum corneum, *J. Contr. Rel.* 94 (2004) 207-216
- Waranuch, J., Ramachandran, C., Weiner, N.D., Controlled topical delivery of hydrocortisone and mannitol via select pathways, *J. Liposome Res.* 9 (1) (1999) 139-153
- Ward, A.J.I., Tallon, R., Penetration enhancer incorporation in bilayers, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 14 (1988) 1155-1166
- Wassermann, K., Müller-Goymann, C.C., Standardised cultivation of artificial skin constructs for drug permeation studies, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333 (1) (2000) 34 (abstract)
- Wassermann, K., Müller-Goymann, C.C., Use of artificial skin constructs for rapid investigation of drug cytotoxicity by an easy in vitro assessment, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334 (2001) Suppl. 1, 35
- Welin-Berger, K., Neelissen, J.A.M., Bergenstahl, B., The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 309-318

- Wertz, P.W., Downing, D.T., Stratum corneum: biological and biochemical considerations, in: Hadgraft, J., Guy, R.H. (Ed.), Transdermal drug delivery Vol. 35, Kapitel 1, Marcel Dekker Inc., New York, 1989a, S. 1-18
- Wertz, P.W., Schwartzendruber, D.C., Kitko, D.J., Madison, K.C., Downing, D.T., The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 93 (1989b) 169-172
- Wester R.C., Noonan, P.K., Maibach, H.I., Frequency of application on percutaneous absorption of hydrocortisone, *Arch. Dermatol.* 113 (1977) 620-629
- Wilkes, G.L., Nguyen, A.L., Wildnauer, R., Structure-property relations of human and neonatal rat stratum corneum. I. Thermal stability of the crystalline lipid structure as studied by X-ray diffraction and differential thermal analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 304 (1973) 267-275
- Winkler, A., Müller-Goymann, C.C., Comparison of cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid and its n-butyl ester on keratinocytes, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 335 (2002a) Suppl. 1, 58
- Winkler, A., Müller-Goymann, C.C., Comparative permeation studies for δ -aminolevulinic acid and its n-butyl ester through stratum corneum and artificial skin construct, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 (3) (2002b) 281-287
- Wohlrab, W., Importance of urea in external therapy, *Hautarzt* 40 (9) (1989) 35-41
- Wohlrab, W., Taube, K.M., Kuchenbecker, I., Penetration und Wirksamkeit von Hydrocortison bei reduzierter Konzentration im Vehikel, *Zeitschrift für Hautkrankheiten* 65 (6) (1990) 534-537
- Yardley, H.J., Summerly, R., Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis, *Pharmac. Ther.* 13 (1981) 357-383
- Zesch, A., Schaefer, H., Penetrationskinetik von radiomarkiertem Hydrokortison aus verschiedenen Salbengrundlagen in die menschliche Haut. II. In vivo, *Arch. Derm. Forsch.* 25 (1975) 245-256
- Ziegenmeyer, J., Haut-Vehikel-Pharmakon, die entscheidenden Kriterien für die perkutane Absorption, *Pharmazie in unserer Zeit* 15 (5) (1986) 129-143
- Zobel, H.P., Brinkmann, I., Fröstl., Heim, S., Müller, C., van Ngyen, T.H., Prescher, K., Zimmer, A., Alternativen zum Salbenrühren im Vergleich, *Pharm. Ztg.* 35 (1997) 24-31

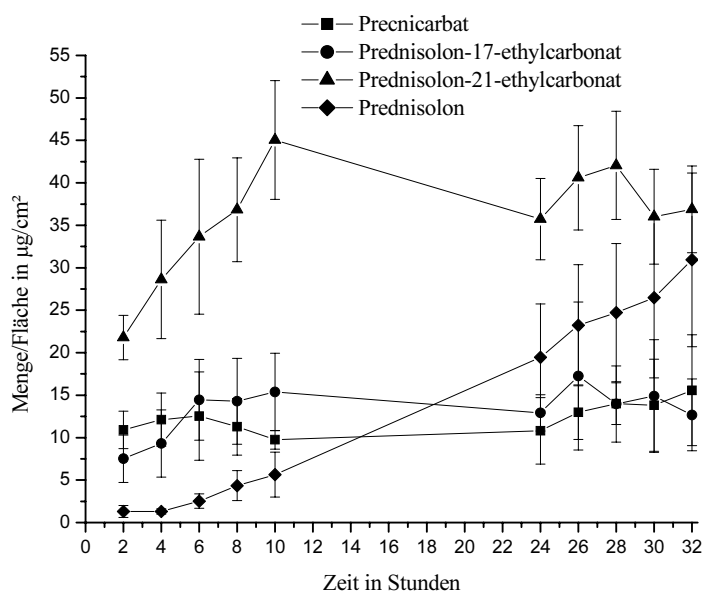
8 Anhang: Permeationsdaten der einzelnen Prednicarbat-Derivate

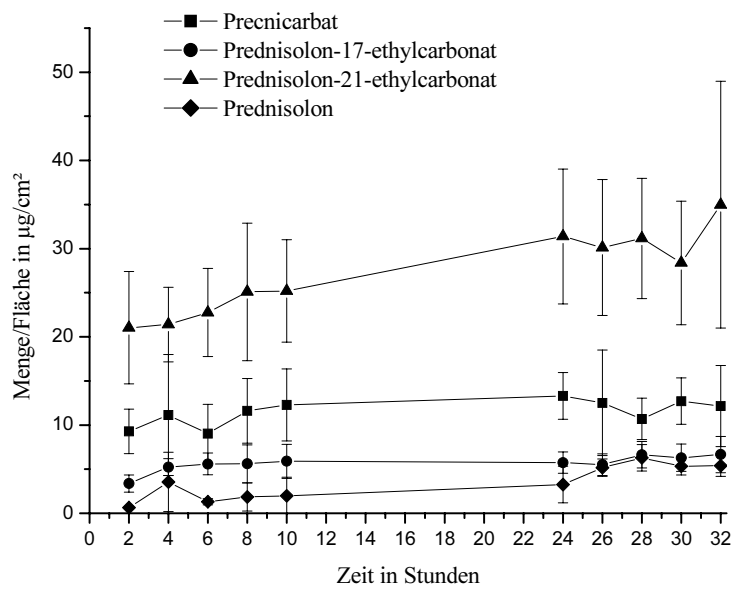
8.1 Original-Formulierungen

a) Dermatop[®] Salbe

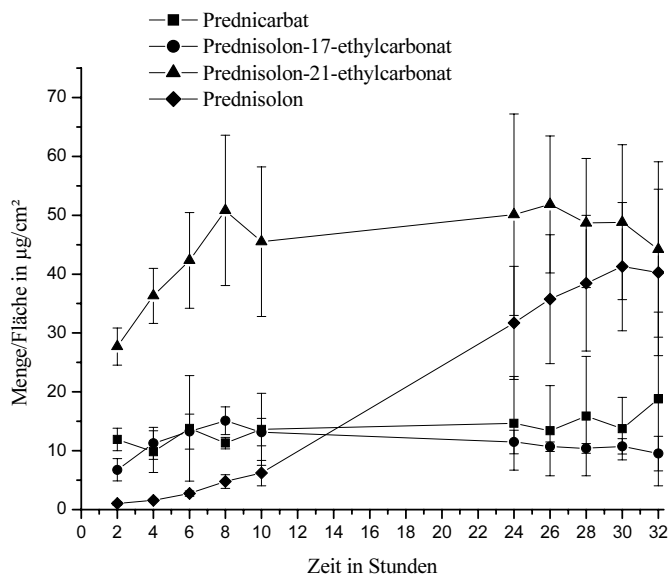


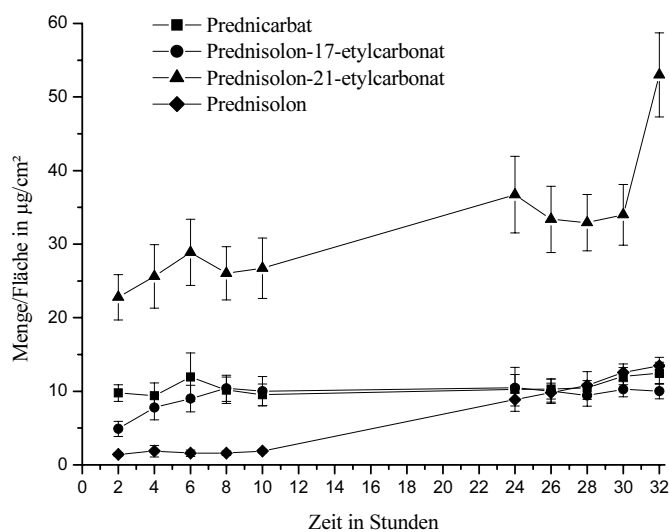
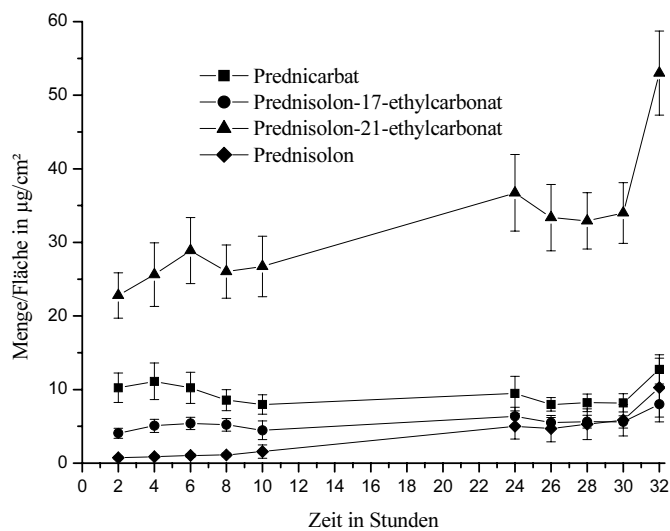
b) Dermatop[®] Fettsalbe



c) Dermatop[®] Creme

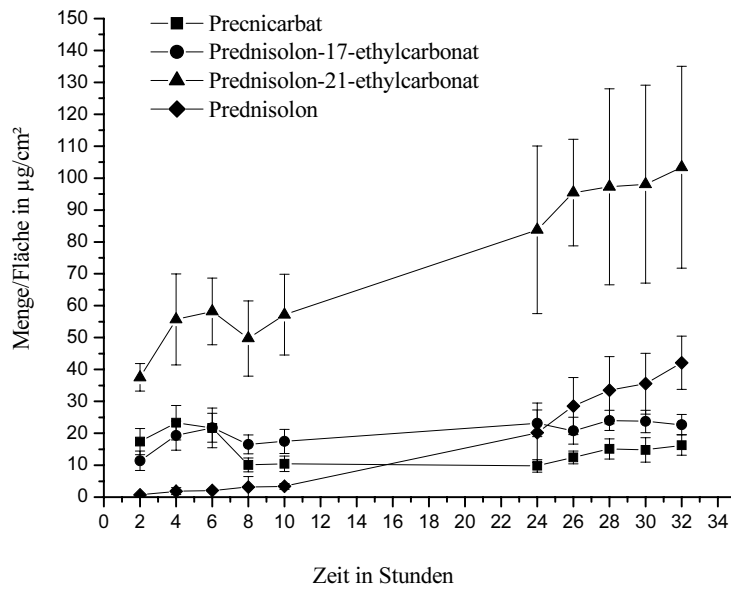
8.2 Verdünnte Formulierungen

a) verdünnte Dermatop[®] Salbe (Salbe/Basissalbe 1/1 m/m)

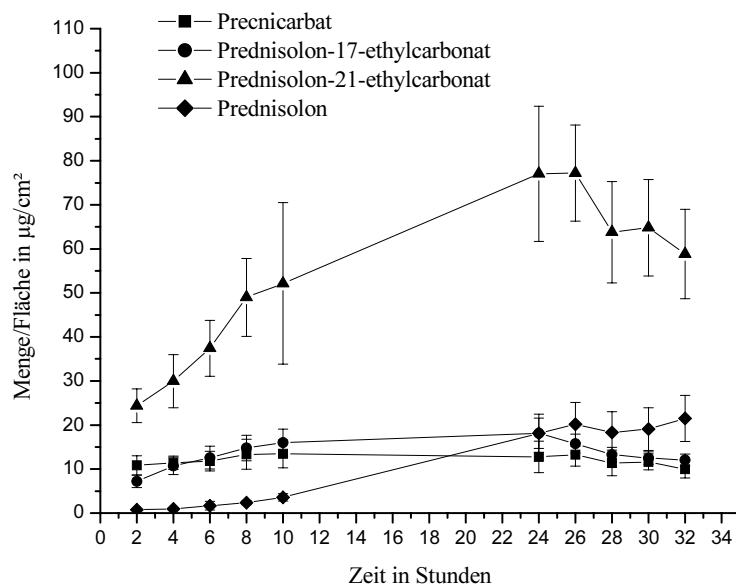
b) verdünnte Dermatop[®] Fettsalbe (Fettsalbe/Basisfettsalbe 1/1 m/m)c) verdünnte Dermatop[®] Creme (Creme/Basiscreme 1/1 m/m)

8.3 Mischungen

a) Mischung Salbe/Fettsalbe 1/1 m/m

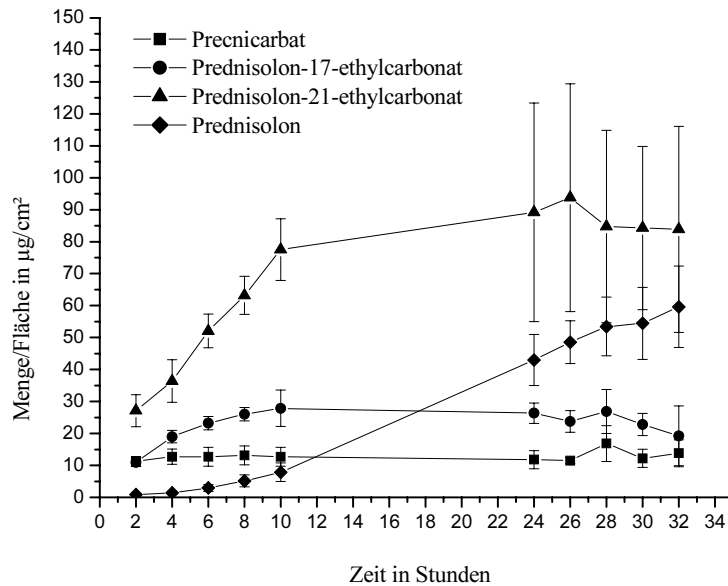


b) Mischung Salbe/Creme 1/1 m/m

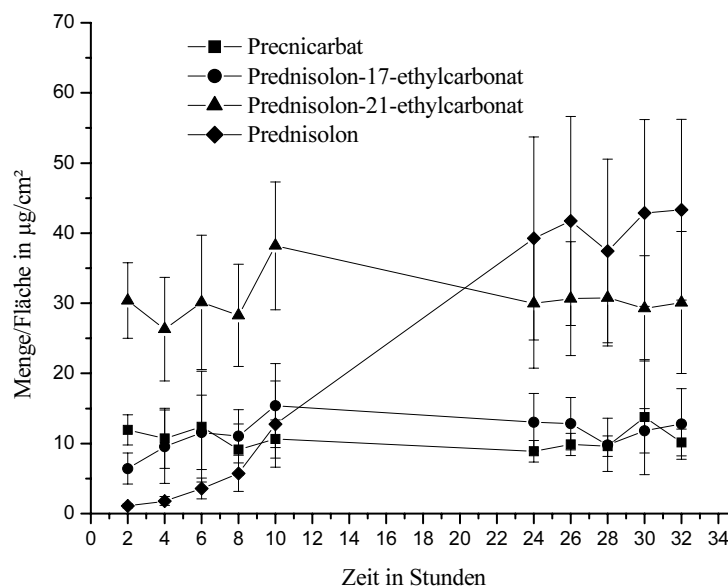


8.4 Formulierungen mit Enhancer-Kombination

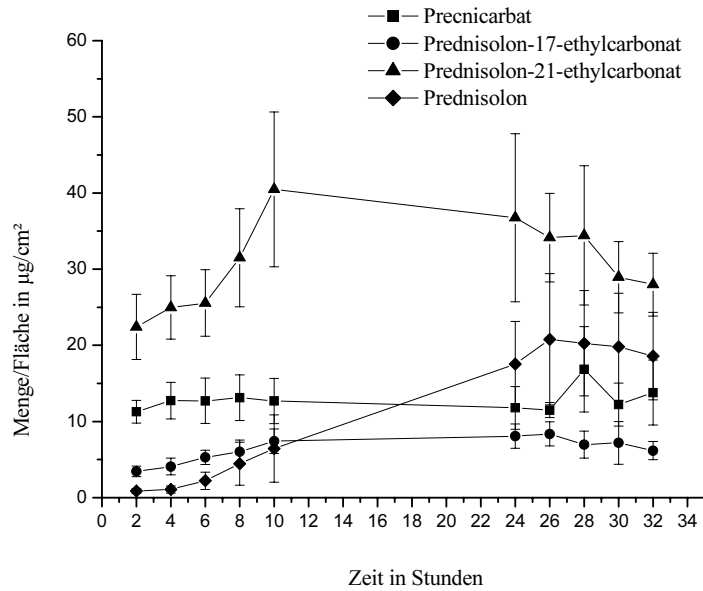
a) Salbe mit Enhancer-Kombination (Zusatz von 5% Isopropylmyristat und 10% Isopropylalkohol)



b) Fettsalbe mit Enhancer-Kombination (Zusatz von 5% Isopropylmyristat und 10% Isopropylalkohol)



c) Creme mit Enhancer-Kombination (Zusatz von 5% Isopropylmyristat und 10% Isopropylalkohol)



8.5 Rezeptur B (siehe Tab. 4.10)

